

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

07.11.03

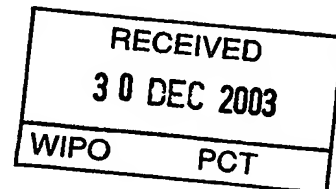
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 1 月    7 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 3 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 2 3 4 3 8 ]

出    願    人            独立行政法人産業技術総合研究所  
Applicant(s):            アマシャム バイオサイエンス株式会社  
                              生化学工業株式会社

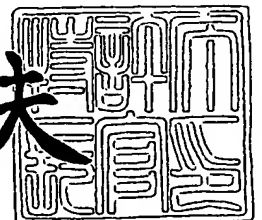


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月 1 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J200202500

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 成松 久

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 佐藤 隆

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

【氏名】 後藤 雅式

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】

【識別番号】 597145779

【氏名又は名称】 アマシャム バイオサイエンス株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000195524

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100120606

【弁理士】

【氏名又は名称】 五丁 龍志

**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 062307**【納付金額】** 21,000円

**【その他】** 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 3 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構、糖鎖合成関連遺伝子ライブラリーの構築委託研究、産業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの）

**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 0118594**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨パジェット病の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づけることを特徴とする骨パジェット病の検出方法。

【請求項2】 「コンドロイチン合成酵素」が、コンドロイチンの非還元末端の糖残基に対してD-グルクロン酸残基又はN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を転移する活性を有する糖転移酵素であることを特徴とする請求項1記載の骨パジェット病の検出方法。

【請求項3】 「コンドロイチン合成酵素」が、「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にD-ガラクトースを $\beta$ 1,4グリコシド結合で転移する糖転移酵素」であることを特徴とする請求項1又は2記載の骨パジェット病の検出方法。

【請求項4】 「コンドロイチン合成酵素遺伝子」が配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号65、配列番号67、又は配列番号69の何れかに記載の塩基配列からなる遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の骨パジェット病の検出方法。

【請求項5】 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号66、配列番号68、又は配列番号70の何れかに記載されたアミノ酸配列又はそれらに相同性を有するアミノ酸配列からなる糖転移酵素の遺伝子の発現が、一部又は完全に抑制されていることを特徴とするノックアウト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、骨パジェット病の検出方法に関連し、より詳細にはコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の合成に関与する酵素の遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づける骨パジェット病の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】



【非特許文献 1】 J. Bone Miner Res., 11(1996), pp.1602-1607

【非特許文献 2】 Endocr. Metab. Clin. North. Am., 24(1995), pp.

437-450

【非特許文献 3】 Am. J. Hum. Genet., 69(2001), pp.1055-1061

骨パジェット病は破骨細胞と骨芽細胞とが共に増加し、骨吸収とそれに伴う二次的な骨形成が局所的に異常に亢進し、骨の変形や肥厚を来す疾病である。この疾病はウイルス感染症が引き金となって発症するという説が有力であり、患者の末梢血液と骨髄の単核球から抽出したRNAを使用して逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション法（RT-PCR法）で麻疹ウイルスを検出できたことが非特許文献 1 には記載されている。しかし、麻疹ウイルスが直接骨パジェット病を引き起こすことは示されておらず、骨パジェット病の病態を引き起こす原因は不明である。この疾病の患者は我が国に於いては希であるが、欧米には多くの患者がおり、高齢となるほど高い発症率となること、女性よりも男性で発症率が高いことが非特許文献 2 には記載されている。

#### 【0 0 0 3】

また、骨パジェット病の原因となる変異遺伝子座は既に公知で非特許文献 3 に記載されているが、この遺伝子座にはいくつもの遺伝子が存在し、何れの遺伝子に変異を来した場合に骨パジェット病となるのかは知られていなかった。従って、簡便な方法で骨パジェット病の診断を行うためには、何れの遺伝子に変異を来した場合に当該疾病が発症するのかを解明する必要があった。

#### 【0 0 0 4】

##### 【発明が解決しようとする課題】

骨パジェット病の病態を引き起こす原因遺伝子を解明し、骨パジェット病の簡便な検出方法に対する期待が高まっていた。

#### 【0 0 0 5】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、骨パジェット病の遺伝子変異が何れもコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の合成に関与するDNAの遺伝子座に起こっていることを発見し、これを骨パジェット病の検出に応用し

て本発明を完成した。

すなわち、本発明の要旨はコンドロイチン合成酵素をコードする遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づけることを特徴とする骨パジェット病の検出方法である。

#### 【0006】

##### 【発明の実施の形態】

以下、発明の実施の形態により本発明を詳説する。

本発明検出方法は、コンドロイチン合成酵素遺伝子の変異又は発現量と、骨パジェット病とを関連づけることを特徴とする骨パジェット病の検出方法である。

#### 【0007】

本発明検出方法に於ける「コンドロイチン合成酵素」とは、コンドロイチン又はコンドロイチン硫酸の合成に関与する酵素である限りに於いて特に限定はされない。つまりコンドロイチンやコンドロイチン硫酸は通常はプロテオグリカンとして生体内で合成されるので、コンドロイチン／コンドロイチン硫酸の基本骨格の伸長に関与する酵素のみならず、例えばプロテオグリカンのタンパク質とグリコサミノグリカンの連結部分を合成する酵素等も包含する。このような酵素が変異を起こしたり、発現がなされないとコンドロイチン／コンドロイチン硫酸の合成がなされない。

#### 【0008】

このような本発明検出方法における「コンドロイチン合成酵素」は、「コンドロイチン／コンドロイチン硫酸の非還元末端の糖残基に対してD-グルクロン酸残基又はN-アセチル-D-ガラクトサミン残基を転移する活性を有する糖転移酵素」

(便宜上、以下「糖転移酵素1」とも記載する)又は「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にD-ガラクトースを $\beta$ 1,4グリコシド結合で結合させる糖転移酵素」(便宜上、以下「糖転移酵素2」とも記載する)であることが好ましい。

#### 【0009】

上述の「糖転移酵素1」とは、「コンドロイチン／コンドロイチン硫酸の非還元末端の糖残基に対してD-グルクロン酸(以下単に「GlcUA」とも記載する)残

基又はN-アセチル-D-ガラクトサミン（以下単に「N-アセチルガラクトサミン」又は「GalNAc」とも記載する）残基を転移する活性」を有する限りにおいて特に限定はされない。このような糖転移酵素1はコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の伸長に関与しており、このような酵素に変異又は発現の抑制が起こると正常なコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の生合成が妨げられ、骨形成に異常を来す骨パジェット病に繋がると考えられる。

#### 【0010】

上記「糖転移酵素1」における「コンドロイチン」とは、ウロン酸（以下単に「UA」とも記載する）残基とGalNAc残基とが1,3グリコシド結合で結合した二糖が、 $\beta$ 1,4グリコシド結合で繰り返して結合してなる基本骨格（すなわち-[4UA1-3GalNAc $\beta$ 1-]<sub>n</sub>: nは2以上の整数を示す）を有するグリコサミノグリカンの一種である。「コンドロイチン」はこの基本骨格に硫酸基が結合していないが、「コンドロイチン硫酸」はGalNAc残基の2位、4位、又は6位、又はウロン酸残基の2位の炭素原子が硫酸化されている。

#### 【0011】

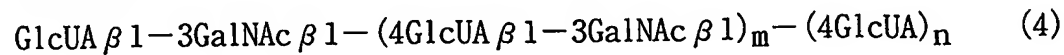
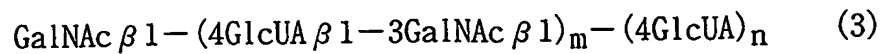
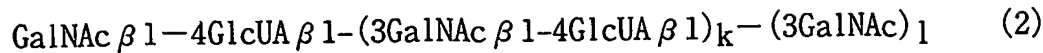
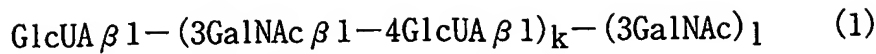
「コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の非還元末端の糖残基」とは、コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の基本骨格を構成するGalNAc残基及びUA残基の何れかであり、「糖転移酵素1」は、上記糖残基がGalNAc残基の場合はUAを転移し、上記糖残基がUA残基の場合はGalNAcを転移するが、何れか一方の転移活性を少なくとも有している酵素である。

このような「糖転移酵素1」の具体例としては、「配列番号2記載のアミノ酸番号1乃至882からなるアミノ酸配列からなるタンパク質を含むコンドロイチン合成酵素」が挙げられる。

#### 【0012】

当該酵素は下記式1で示される構造を含むGalNAc受容体にGalNAc供与体基質（例えばUDP-GalNAc）からGalNAc残基を転移し、下記式2で示される構造を含む化合物を合成する活性を有すると共に、下記式3で示される構造を含むGlcUA受容体にGlcUA供与体基質（例えばUDP-GlcUA）からGlcUA残基を転移し、下記式4で示される構造を含む化合物を合成する活性を有する（本明細書中参考例2参照）

## 【0013】



## 【0014】

式1乃至4中、「-」はグリコシド結合を示し、数字は前記グリコシド結合が存在する糖環の炭素位置を示す。また「 $\alpha$ 」及び「 $\beta$ 」は糖環1位の前記グリコシド結合のアノマーを示し、5位CH<sub>2</sub>OH又はCOOHとの位置関係がトランスのものを「 $\alpha$ 」、シスのものを「 $\beta$ 」で示す。k及びmは1以上の整数を示し、l及びnは1又は0を示す。

## 【0015】

塩基配列（配列番号1）からなる当該酵素遺伝子はOMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)を使用して遺伝子座を調べると5q31.1に存在することが明らかとなった（参考例1参照）。

## 【0016】

また「糖転移酵素1」の他の例としては、例えば「配列番号4記載のアミノ酸番号1乃至755からなるアミノ酸配列からなるタンパク質を含むコンドロイチン合成酵素」が挙げられる。

## 【0017】

当該酵素は前記式1で示される構造を含むGalNAc受容体にGalNAc供与体（例えばUDP-GalNAc）からGalNAc残基を転移し、前記式2で示される構造を含む化合物を合成する活性を有すると共に、前記式3で示される構造を含むGlcUA受容体にGlcUA供与体（例えばUDP-GlcUA）からGlcUA残基を転移し、前記式4で示される構造を含む化合物を合成する活性を有する（本明細書中参考例4参照）。

## 【0018】

塩基配列（配列番号3）からなる当該酵素遺伝子はOMIMを使用して遺伝子座を調べると遺伝子座を調べると2q36.3に存在することが明らかとなった（本明細書中

参考例 3 参照)。

【0019】

なお、「コンドロイチンの非還元末端の糖残基に対してGlcUA残基又はGalNAc残基を転移する活性」は、例えば放射能などで標識したGlcUA供与体基質又はGalNAc供与体基質と、放射能で標識していないコンドロイチン/コンドロイチン硫酸(これらを低分子化して得られる低分子コンドロイチン/低分子コンドロイチン硫酸(20糖以下の糖鎖)も含む)の受容体基質とを用いて、酵素反応させた後、反応生成物についてゲル濾過とオートラジオグラフやシンチレーションカウンターなどを用いることで容易に検出することができる。上記GlcUA供与体基質としては、GlcUAを有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、例えばアデノシン二リン酸-D-グルクロン酸(ADP-GlcUA)、ウリジン二リン酸-D-グルクロン酸(UDP-GlcUA)、グアノシン二リン酸-D-グルクロン酸(GDP-GlcUA)、シチジン二リン酸-D-グルクロン酸(CDP-GlcUA)等が例示され、UDP-GlcUAが最も好ましい。生体内ではUDP-GlcUAがGlcUA供与体基質として働いているからである。

【0020】

また、上記GalNAc供与体基質としては、GalNAcを有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、例えばアデノシン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン(ADP-GalNAc)、ウリジン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン(UDP-GalNAc)、グアノシン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン(GDP-GalNAc)、シチジン二リン酸-N-アセチル-D-ガラクトサミン(CDP-GalNAc)等が例示され、UDP-GalNAcが最も好ましい。生体内ではUDP-GalNAcがGalNAc供与体基質として働いているからである。

【0021】

上記「糖転移酵素2」は「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にD-ガラクトース(以下単に「ガラクトース」又は「Gal」とも記載する)を $\beta$ 1,4グリコシド結合で転移する働きを有する糖転移酵素」である限りに於いて特に限定はされない。このような糖転移酵素2はコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の生成初期の段階に関与しており、このような酵素に変異が起こると正常なコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の生合成が妨げられるため、骨形成に異常を来す骨

パジェット病に繋がると考えられる。

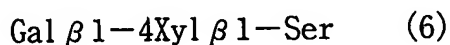
#### 【0022】

上記「糖転移酵素2」に於ける「アミノ酸残基」とは、ペプチド（タンパク質）を形成するアミノ酸であることが好ましく、特に生体内に存在するコンドロイチン/コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの構造中、ペプチド（タンパク質）とコンドロイチン/コンドロイチン硫酸との結合部分に存在する特徴的四糖構造（ $\text{GlcUA } \beta 1-3 \text{Gal } \beta 1-3 \text{Gal } \beta 1-4 \text{Xyl}$ ：以下「リンケージ四糖」と記載する）の還元末端に存在するキシロースが結合しているアミノ酸が最も好ましい。このようなアミノ酸として最も好ましくはL-セリンが例示される。

#### 【0023】

すなわち「糖転移酵素2」は下記式5で示される構造を含むGal受容体にGal供与体基質（例えばUDP-Gal）からGal残基を転移し、下記式6で示される構造を含む化合物を合成する活性を有する（本明細書中参考例5参照）。

#### 【0024】



#### 【0025】

上記式5及び6において、「Ser」は上記「Xyl」で示されるキシロース残基がその側鎖に結合したセリン残基（ペプチド鎖中の場合を含む）を示し、「Xyl」は前記「Ser」で示されるセリン残基の側鎖に結合したキシロース残基を示し、「-」、「 $\beta$ 」、数字は前記式1乃至4と同じである。

#### 【0026】

塩基配列（配列番号5）からなる当該酵素遺伝子はOMIMを使用して遺伝子座を調べると5q35に存在することが明かとなった（本明細書中参考例5参照）。

#### 【0027】

なお、「『アミノ酸残基に結合したキシロース残基』にGalを $\beta 1,4$ グリコシド結合で転移する活性」は、例えば放射能などで標識したGal供与体基質と、放射能で標識していないキシロース結合ペプチド（例えば配列番号15：第9番目のアミノ酸残基であるセリン残基に側鎖としてキシロースが結合しているピクニン

のN-末端配列：ペプチド研究所製）とを用いて反応させた後、反応生成物についてゲル濾過とオートラジオグラフやシンチレーションカウンターなどを用いることで容易に検出することができる。なお、上記Gal供与体基質としては、Galを有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、例えばアデノシン二リン酸-D-ガラクトース（ADP-Gal）、ウリジン二リン酸-D-ガラクトース（UDP-Gal）、グアノシン二リン酸-D-ガラクトース（GDP-Gal）、シチジン二リン酸-D-ガラクトース（CDP-Gal）等が例示され、UDP-Galが最も好ましい。生体内ではUDP-GalがGal供与体基質として働いているからである。

#### 【0028】

骨パジェット病に於ける遺伝子の変異としては、例えば亜種であるPDB2においては18q22.1、PDB3においては5q35、PDB4においては5q31に変異が起きていることが知られており（OMIM #602080）、また家族性の骨パジェット病に於ける遺伝子の変異として、2q36、10q13、及び5q35に変異が起きていることが知られている（Am. J. Hum. Genet. 69(2001), pp.1055-1061）。このような既知の変異部位には数個乃至十数個の遺伝子がコードされているが、上述した各コンドロイチン合成酵素遺伝子の存在位置は配列番号1（K3）が5q31.1、配列番号3（K11）が2q36.3、そして配列番号5（ $\beta$ 4GalT7）は5q35であり、上記変異の存在する位置と各々完全に一致している。このようにコンドロイチン/コンドロイチン硫酸の合成に関わるこれらの酵素の遺伝子が全て骨パジェット病の遺伝子変異部位と重複することから、これらの遺伝子の変異は、コンドロイチン/コンドロイチン硫酸の生合成に障害を起こして骨パジェット病の発症に繋がっている蓋然性が極めて高い。

#### 【0029】

本発明検出方法は具体的には以下の様にして行うことができる。

すなわち、例えば遺伝子を含む検体（例えば上皮組織、結合組織等、好ましくは結合組織が挙げられ、採取が極めて容易で、且つ得られた検体が新鮮であることから特に好ましくは血液が挙げられる）から、例えば既存のRNA調製キット（例えばRNA Extraction Kit：アマシャムバイオサイエンス株式会社製など）を用いて全RNAを抽出・精製することができる。抽出・精製された全RNAを用いてK3、

K11、及び $\beta$ 4Gal-T7の発現量を既存のキット（例えばSUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR（インビトロジェン社製）等）を用いてRT-PCR法などの方法で定量することができる。使用する5'プライマー、3'プライマー、及びプローブの組み合わせの例としては、K3の発現量を定量する場合は配列番号56、配列番号57、配列番号58、K11の発現量を定量する場合は配列番号59、配列番号60、配列番号61、 $\beta$ 4Gal-T7の発現量を定量する場合は配列番号62、配列番号63、配列番号64の組み合わせが挙げられるが、当業者であれば定量の目的に応じて適宜選択して調製することが可能である。

#### 【0030】

そして、例えばこれらの定量の結果、K3、K11及び $\beta$ 4GalT7の何れかの遺伝子の発現が一部又は完全に抑制されている患者を骨パジェット病の危険性が高い患者とすることができる。また、上記定量は上記で例示したようにK3、K11及び $\beta$ 4Gal-T7の遺伝子の転写量をRNA量から定量して行うこともできるが、例えば常法に従って調製したK3、K11又は $\beta$ 4Gal-T7の抗体などを使用してK3、K11又は $\beta$ 4Gal-T7のタンパク質を直接定量して行うことも可能であり、また検体中の上記酵素の活性を直接測定して酵素量を定量して骨パジェット病と関連づけることも可能である。

#### 【0031】

また、上記のような酵素の遺伝子の発現量の測定によることなく、本明細書配列表に記載されたK3、K11及び $\beta$ 4Gal-T7の塩基配列を元に適宜調製したプライマーを用いてゲノムのDNAから直接K3、K11又は $\beta$ 4Gal-T7の遺伝子をPCR法などの手法を用いて増幅し、公知の塩基配列決定法に従って塩基配列を解析し、これらの遺伝子に変異が存在する場合に骨パジェット病であると結論づけることも可能である。

#### 【0032】

また、本発明によりK3、K11及び $\beta$ 4Gal-T7が骨パジェット病に関連していることが明かとなったので、実験動物において、これらの遺伝子の発現を一部又は完全抑制することによって骨パジェット病の病態を示すノックアウト動物を調製することも可能である。ノックアウト動物としては、例えば、マウス、ラット、



ウサギ、イヌ、ネコ、サルなどの哺乳動物が好ましく、ノックアウト動物調製の手法がある程度確立していることから、マウス又はラットが最も好ましいが、これに限定はされない。

#### 【0033】

例えば骨パジェット病の病態を示すノックアウトマウス（病態マウス）は例えばジーンターゲティングの最新技術（八木健編集 羊土社）、ジーンターゲティング（野田哲生監訳 メディカル・サイエンス・インターナショナル社）などの記載に従って行うことができる。

#### 【0034】

例えば、ノックアウトしたいマウスの遺伝子（K3（mK3：配列番号65）、K11（mK11：配列番号67）又は $\beta$ 4Gal-T7（m $\beta$ 4Gal-T7：配列番号69））の活性化ドメインを含むexon（mK3の場合にはORF部分の3番目のexon（1560 bp）を含む断片、mK11の場合にはORF全長に相当する4598bpを含む断片、m $\beta$ 4Gal-T7の場合にはORFの2から6番目のexonを含む断片）を中心とした染色体断片（約10kb）を挿入した直鎖状ターゲティングベクター80 $\mu$ gをES細胞（E14/129Svマウス由来）にエレクトロポレーション法などの公知の方法により導入し、G418耐性のコロニーを選択し、このG418耐性コロニーを24ウェルプレートに移して培養を行うことができる。細胞の一部を凍結保存した後、残りのES細胞からDNAを抽出し、公知の塩基配列解析方法により組換が起こっているクローンを120コロニー程度選択する。さらに、サザンブロッティング法などの方法を用いて組換が予定通り起こっている確認を行い、最終的に組換体を10クローン程度選択し、そのうちの2クローン程度のES細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞内に注入する。このようにしてES細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させることができる。キメラマウスをジャームトランスミッションによりヘテロノックアウトマウスを得ることができる。

#### 【0035】

また、small interfering RNA法（T.R. Brummelkamp et al., Science, 296, 550-553 (2002)）などの「遺伝子発現を抑制する方法」でもノックアウトマウスを作製することができる。

## 【0036】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。

## 参考例 1: コンドロイチン硫酸合成酵素 (K3) の調製

## (1) cDNAのクローニングと発現ベクターの構築

$\beta$ 1,4ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 4Gal-T) のアミノ酸配列 (GenBank accession No.D29805がコードするアミノ酸配列) をクエリーとして、BLAST検索を行った。その結果、Expression Sequence Tag (EST: GenBank accession No. AC0004219) が見つかった。しかし、この配列は不完全であったため、ゲノムデータベースから、GenScan (米国スタンフォード大学) によりORFを調べた。その結果、配列番号1記載の塩基配列 (コードされるアミノ酸配列は配列番号2) を発見した。配列番号1記載の塩基配列からなる遺伝子は、少なくともヒト脳で発現していることをMarathon-Ready cDNA (クロンテック社製) を鋳型としたRT-PCR法によって確認した (PCR用のプライマーとしては配列番号9及び配列番号10、並びに配列番号11及び配列番号12の5'プライマーと3'プライマーとの組み合わせを使用した)。この遺伝子の膜貫通領域を含む領域 (配列番号2のアミノ酸番号1乃至129からなる領域) を除く可溶性領域をクローニングするため、配列番号7及び配列番号8の2種のプライマーを用いて常法に従ってPCRを行った。使用した鋳型cDNAはMarathon-Ready cDNA human brain (クロンテック社製) を使用した。増幅された約2.3kbのバンドを常法に従ってHindIIIとXbaIとで消化し、ほ乳類細胞用の発現ベクターpFLAG-CMV-1 (シグマ社製) のHindIIIとXbaI部位に常法に従って挿入して発現ベクター (K3-FLAG-CMV1) を得た。得られた発現ベクターの塩基配列を確認したところ、配列番号1記載の塩基配列の塩基番号388乃至2649の塩基配列からなるDNA断片が挿入されていることを確認した。この塩基配列を有するDNAのゲノム上の位置を、OMIMを使用して確認したところ、5q31.1に存在することが明かとなった。

## 【0037】

## (2) K3の調製

K3-FLAG-CMV1 15  $\mu$ gをTransFast (プロメガ社製) を用い、プロトコールに従っ

て、100 mm培養皿に70%コンフルエントになるように培養したCOS7細胞に遺伝子を導入した。3日間培養した上清を回収し、0.22  $\mu$ mのフィルターで濾過後、その上清10mlにAnti-FLAG M2-Agarose Affinity Gel (シグマ社製)100  $\mu$ lを加え、4℃で一晩、転倒混和した。反応後、ゲルを50mM Tris-HCl、pH7.4/20%グリセロールで3回洗浄後、27Gの注射針をつけたシリンジを用い余分な洗浄液を除いた。このゲルを50mmol/L Tris-HCl、pH7.4 (20%グリセロール、10mmol/L フェニルメチルスルホニルフルオリド、1  $\mu$ g/ml leupeptin、1  $\mu$ g/ml pepstatin) に50%(v/v)となるように懸濁し、これを遠心分離した後に上清を取り除いて酵素吸着ゲル懸濁液とした。

### 【0038】

#### 参考例 2

K3を用いたコンドロイチン骨格の伸長

#### (1) コンドロイチン/コンドロイチン硫酸奇数糖の調製

コンドロイチン (サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を化学的に脱硫酸化したもの: 生化学工業株式会社製) 及びコンドロイチン硫酸 (サメ軟骨由来: 生化学工業株式会社製: コンドロイチン硫酸Cとも呼ばれている) をウシ臍丸ヒアルロニダーゼ (シグマ社製) で限定消化後、反応液を10分間100℃で保ち、酵素を加熱失活させた。この反応液をSuperdex 30カラム (60×1.6cm: アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件; 移動相: 0.2mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、流速: 2ml/分) にかけて、溶出液を225nmの吸光度でモニターしながら2ml毎に分画し、10糖相当画分をプールした。画分をPD10カラム (アマシャムバイオサイエンス株式会社製) により脱塩後、常法に従ってカルバゾール硫酸法によりウロン酸定量を行い、凍結乾燥した。凍結乾燥物を1mMとなるように蒸留水に溶解し、偶数オリゴ糖サンプルとした (コンドロイチン由来の10糖を「CH10」、コンドロイチン硫酸由来の10糖を「CS10」と記載する)。

### 【0039】

10nmol/Lの $\text{MnCl}_2$ 、171  $\mu$ mol/LのATPナトリウム塩を含む50mmol/L MES緩衝液 (pH6.5) に酵素吸着ゲル懸濁液10  $\mu$ l、被検物質 (コンドロイチン (CHEL)、コンドロイチン硫酸 (CSEL)、CH10又はCS10) を1nmol、 $[^3\text{H}]\text{UDP-GalNAc}$ を0.036nmol

添加して全量を30 $\mu$ lとした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

#### 【0 0 4 0】

各々の反応液を孔径0.22 $\mu$ mのマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、Superdex peptideカラム（30 $\times$ 1.0cm：アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速1.0ml/分）で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した（図1）。その結果、強いGalNAc転移活性がCHEL（17乃至18画分）、CH10（23画分）及びCS10（23画分）をGalNAc受容体基質とした場合に観察され、CSELに対してはGalNAc転移活性は観察されなかった（16画分）。CH10及びCS10から得られた反応生成物の23画分は11糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH10から得られた11糖を「CH11(K3)」、CS10から得られた11糖を「CS11(K3)」と記載する。

#### 【0 0 4 1】

CS11(K3)の21～25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mMの酢酸ナトリウムを含む0.1mol/LのTrisHCl緩衝液（pH7.4）100 $\mu$ lに溶解し（CS11(K3)A）、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した（100mUのコンドロイチナーゼACII（生化学工業株式会社製）を100 $\mu$ lのCS11(K3)画分に溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた：CS11(K3)B）。

#### 【0 0 4 2】

CS11(K3)AとCS11(K3)Bとを孔径0.22 $\mu$ mのマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、Superdex peptideカラム（30 $\times$ 10mm：アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速0.5ml/分）で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS11(K3)Bにおいて単糖画分に放射能ピークがシフトした（図2）。この結果から、K3はコンドロイチン硫酸由来の10糖の非還元末端のGlcUAに対してGalNAcを $\beta$ 1,4結合で転移し、11糖を調製することができることが明かとなった。

## 【0043】

## (2) コンドロイチン／コンドロイチン硫酸偶数糖の調製

コンドロイチン（サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を化学的に脱硫酸化：生化学工業株式会社製）及びコンドロイチン硫酸（サメ軟骨由来：生化学工業株式会社製：コンドロイチン硫酸Cとも呼ばれている）をウシ睾丸ヒアルロニダーゼ（シグマ社製）で限定消化後、反応液を10分間100℃で保ち、酵素を加熱失活させた。この反応液を10,000×gで10分間遠心処理し、上清を回収して更にウシ肝臓由来βグルクロニダーゼ（シグマ社製）で消化した。酵素反応は反応液を10分間100℃で保って停止させた。この反応液をSuperdex 30カラム（60×1.6cm：アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、流速：2ml/分）にかけ溶出液を225nmの吸光度でモニターしながら、2ml毎に分画し、11糖相当画分をプールした。各画分をPD10カラム（アマシャムバイオサイエンス株式会社製）により脱塩後、常法に従ってカルバゾール硫酸法によりウロン酸定量を行い、凍結乾燥した。凍結乾燥物を1mmol/Lとなるように蒸留水に溶解し、奇数オリゴ糖サンプルとした（コンドロイチン由来の11糖：「CH11」、コンドロイチン硫酸由来の11糖：「CS11」）。

## 【0044】

またコンドロイチン（サメ軟骨由来コンドロイチン硫酸を化学的に脱硫酸化：生化学工業株式会社製）及びコンドロイチン硫酸（サメ軟骨由来：生化学工業株式会社製：コンドロイチン硫酸Cとも呼ばれている）をウシ肝臓由来βグルクロニダーゼ（シグマ社製）で消化してサンプルとした（各々「CHOL」及び「CSOL」と記載する）。

## 【0045】

10mmol/Lの $\text{MnCl}_2$ 、50mmol/L 酢酸緩衝液（pH5.6）に酵素吸着ゲル懸濁液10μl、被検物質（CHOL、CSOL、CH11又はCS11）を1nmol、 $[^{14}\text{C}]$ UDP-GlcUAを0.432nmol添加して全量を30μlとした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

## 【0046】

各々の反応液を孔径0.22μmのマикроフィルター（ミリポア社製）で濾過し

た後、Superdex peptideカラム(30×1.0cm:アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件;移動相:0.2mol/L NaCl、流速0.5ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した(図3)。その結果、強いGlcUA転移活性がCHOL(17乃至18画分)、CH11(23画分)及びCS11(23画分)をGlcUA受容体基質とした場合に観察され、CSOLに対してはGlcUA転移活性が観察されなかった(16画分)。CH11及びCS11から得られた反応生成物の22~23画分は12糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH11から得られた12糖を「CH12(K3)」、CS11から得られた12糖を「CS12(K3)」と記載する。

#### 【0047】

CS12(K3)の21乃至25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mmol/Lの酢酸ナトリウムを含む0.1mol/LのTrisHCl緩衝液(pH7.4)100 $\mu$ lに溶解し(CS12(K3)A)、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した(100mユニットのコンドロイチナーゼACII(生化学工業株式会社製)を100 $\mu$ lのCS11(K3)画分に溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた:CS12(K3)B)。

#### 【0048】

CS12(K3)AとCS12(K3)Bとを孔径0.22 $\mu$ mのマイクロフィルター(ミリポア社製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×1.0cm:アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件;移動相:0.2mol/L NaCl、流速0.5ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS12(K3)Bにおいて二糖画分に放射能ピークがシフトした(図4)。この結果から、K3はコンドロイチン硫酸由来の11糖に対してGlcUAを $\beta$ 1,3結合で転移し、12糖を調製することができることが明かとなった。

#### 【0049】

##### 参考例3

コンドロイチン硫酸合成酵素(K11)の調製

(1)cDNAのクローニングと発現ベクターの構築

コンドロイチン硫酸グルクロン酸転移酵素(CSGlcA-T)のアミノ酸配列(GenB

ank accession No. AB037823 がコードするアミノ酸配列) をクエリーとして、BLAST 検索を行った。その結果、EST (GenBank accession No. NM\_018590) が見つかった。しかし、この配列は不完全であったため、ゲノムデータベースから、GenScan (米国スタンフォード大学) により ORF を調べた。その結果、配列番号 3 記載の塩基配列 (コードされるアミノ酸配列は配列番号 4) を発見した。配列番号 3 記載の塩基配列からなる遺伝子は、少なくともヒト脳で発現していることを Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) を鋳型とした RT-PCR 法によって確認した。この遺伝子の膜貫通領域を含む領域 (配列番号 4 のアミノ酸番号 1 乃至 96 からなる領域) を除く可溶性領域をクローニングするため、配列番号 13 及び配列番号 14 の 2 種のプライマーを用いて常法に従って PCR を行った。使用した鋳型 cDNA は Marathon-Ready cDNA human brain (クロンテック社製) を使用した。増幅された約 2kb のバンドを常法に従って EcoRI と BamHI で消化し、ほ乳類細胞用の発現ベクター pFLAG-CMV-1 (シグマ社製) の EcoRI と BamHI 部位に常法に従って挿入して K11-FLAG-CMV1 を得た。得られたベクターの塩基配列を確認したところ、配列番号 3 記載の塩基配列の塩基番号 287 乃至 2328 の塩基配列からなる DNA 断片が挿入されていることを確認した。この塩基配列を有する DNA のゲノム上の位置を、OMIM を使用して確認したところ、2q36.3 に存在することが明かとなった。

#### 【0050】

##### (2) K11 の調製

K11-FLAG-CMV1 15mg を TransFast (プロメガ社製) を用い、プロトコールに従って 100 mm 培養皿に 70% コンフルエントになるように培養した COS7 細胞に遺伝子を導入した。3 日間培養した上清を回収し、0.22  $\mu$ m のフィルターで濾過後、その上清 10ml に Anti-FLAG M2-Agarose Affinity Gel (シグマ社製) 100  $\mu$ l を加え、4℃で一晩、転倒混和した。反応後、ゲルを 50mmol/L Tris-HCl、pH7.4 (20% グリセロール) 3 回洗浄後、27G の注射針をつけたシリンジを用い余分な洗浄液を除いた。このゲルを 50mmol/L pH7.4 の TrisHCl 緩衝液、(20% グリセロール、10mmol/L フェニルメチルスルホニルフルオリド、1  $\mu$ g/ml leupeptin、1  $\mu$ g/ml pepstatin) に 50% (v/v) となるように懸濁し、これを遠心分離した後に上清を取り除いて酵素吸着ゲル懸濁液とした。

## 【0051】

## 参考例 4

K11を用いたコンドロイチン骨格の伸長

## (1)コンドロイチン／コンドロイチン硫酸奇数糖の調製

10nmol/Lの $\text{MnCl}_2$ 、171 $\mu\text{mol/L}$ のATPナトリウム塩を含む50mmol/L MES緩衝液 (pH6.5) に酵素吸着ゲル懸濁液10 $\mu\text{l}$ 、被検物質 (CHEL、CSEL、CH10又はCS10) を1nmol、 $[\text{H}^3]\text{UDP-GalNAc}$ を0.036nmol添加して全量を30 $\mu\text{l}$ とした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

## 【0052】

各々の反応液を孔径0.22 $\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社製) で濾過した後、Superdex peptideカラム (30×1.0cm: アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件; 移動相: 0.2mol/L NaCl、流速0.5ml/分) で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した (図5)。その結果、強いGalNAc転移活性がCHEL (18画分)、CH10 (23画分) 及びCS10 (23画分) をGalNAc受容体基質とした場合に観察され、CSELに対しては弱いGalNAc転移活性が観察された (16画分)。CH10及びCS10から得られた反応生成物の22~23画分は11糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH10から得られた11糖を「CH11(K11)」、CS10から得られた11糖を「CS11(K11)」と記載する。

## 【0053】

CS11(K11)の21~25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mMの酢酸ナトリウムを含む0.1mol/LのTrisHCl緩衝液 (pH7.4) 100 $\mu\text{l}$ に溶解し (CS11(K11)A)、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した (100mユニットのコンドロイチナーゼACII (生化学工業株式会社製) を100 $\mu\text{l}$ のCS11画分に溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた: CS11(K11)B)。

## 【0054】

CS11(K11)AとCS11(K11)Bとを孔径0.22 $\mu\text{m}$ のマイクロフィルター (ミリポア社



製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×10mm:アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件;移動相:0.2mol/L NaCl、流速0.5 ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS11(K11)Bにおいて三糖画分に放射能ピークがシフトした(図6)。この結果から、K11はコンドロイチン硫酸由来の10糖の非還元末端のGlcUAに対してGalNAcを $\beta$ 1,4結合で転移し、11糖を調製することができることが推測された。

#### 【0055】

#### (2)コンドロイチン/コンドロイチン硫酸偶数糖の調製

10nmol/LのMnCl<sub>2</sub>、50mmol/L 酢酸緩衝液(pH5.6)に酵素吸着ゲル懸濁液10 $\mu$ l、被検物質(CHOL、CSOL、CH11又はCS11)を1nmol、[<sup>14</sup>C]UDP-GlcUAを0.432nmol添加して全量を30 $\mu$ lとした。酵素反応は37℃で1時間行い、その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

#### 【0056】

各々の反応液を孔径0.22 $\mu$ mのマイクロフィルター(ミリポア社製)で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×1.0cm:アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件;移動相:0.2mol/L NaCl、流速0.5ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した(図3)。その結果、強いGlcUA転移活性がCHOL(18画分)、CH11(23画分)及びCS11(22画分)をGlcUA受容体基質とした場合に観察され、CSOLに対してはGlcUA転移活性が観察されなかった。CH11及びCS11から得られた反応生成物の22乃至23画分は12糖が溶出する分子量を示す画分だった。CH11から得られた12糖を「CH12(K11)」、CS11から得られた12糖を「CS12(K11)」と記載する。

#### 【0057】

CS12(K11)の21乃至25画分を回収してプールし、PD10カラムにより脱塩した。このようにして得られたサンプルを二等分して凍結乾燥した。二分した一方を30mmol/Lの酢酸ナトリウムを含む0.1mol/LのTrisHCl緩衝液(pH7.4)100 $\mu$ lに溶解し(CS12(K11)A)、他方をコンドロイチナーゼACIIで消化した(100mユニットのコンドロイチナーゼACII(生化学工業株式会社製)を100 $\mu$ lのCS11(K11)画分に

溶解し、37℃で10時間酵素消化し、加熱して酵素を失活させた：CS12(K11)B)。

#### 【 0 0 5 8 】

CS12(K11)AとCS12(K11)Bとを孔径0.22 $\mu$ mのマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、Superdex peptideカラム(30×1.0cm：アマシャムバイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速0.5 ml/分)で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、CS12(K11)Bにおいて二糖画分に放射能ピークがシフトした（図4）。この結果から、本発明酵素はコンドロイチン硫酸由来の11糖に対してGlcUAを $\beta$ 1,3結合で転移し、12糖を調製することができることが明らかとなった。

#### 【 0 0 5 9 】

##### 参考例 5

コンドロイチン硫酸合成酵素（ $\beta$ 4Gal-T7）の調製と活性の確認

Almeidaらの方法（J. Biol. Chem., 274, 37, 26165-26171(1999)のEXPERIMENTAL PROCEDURESの記載）に従って $\beta$ 4Gal-T7のクローニングを行なった。得られたクローンの塩基配列を常法に従って確認したところ、配列番号5記載の塩基配列からなることが明かとなった。この塩基配列を有するDNAのゲノム上の位置を、MIMを使用して確認したところ、5q35に存在することが明かとなった。

#### 【 0 0 6 0 】

更に、Gotohらの方法（J. Biol. Chem., 277, 41, 38189-38196(2002)に従って $\beta$ 4Gal-T7の発現を行なって $\beta$ 4Gal-T7が結合したアフィニティー担体の懸濁液を得た後、ゲル10 $\mu$ l、受容体基質（キシロース結合ペプチド（配列番号15：第9番目のアミノ酸残基であるセリンに側鎖としてキシロースが結合しているピクニンのN-末端配列）：ペプチド研究所製）6.25mg、171 $\mu$ molのアデノシン三リン酸（ATP）ナトリウム塩、0.036molの $[^3\text{H}]$ UDP-Galを10nmol/LのMnCl<sub>2</sub>を含む50mmolのMES緩衝液（pH6.5）に加えて全量を30 $\mu$ lとし、37℃で1時間反応を行なった。その後反応液を100℃で1分間保って酵素を失活させて反応を停止させた。

#### 【 0 0 6 1 】

反応液を孔径0.22 $\mu$ mのマイクロフィルター（ミリポア社製）で濾過した後、S

uperdex peptideカラム (30×1.0cm：アマシャム バイオサイエンス株式会社製、クロマトグラフィー条件；移動相：0.2mol/L NaCl、流速1.0ml/分) で分離し、溶出液を0.5mlの画分毎に分取して、シンチレーションカウンターで放射能を測定した。その結果、 $[^3\text{H}]\text{UDP-Gal}$ の溶出画分とは別の高分子の画分に強い放射能が観察された。このことから、 $\beta 4\text{Gal-T7}$ が受容体基質にガラクトースを結合させていることが裏付けられた。

#### 【 0 0 6 2 】

##### 実施例 1 血液サンプルからのDNA抽出と塩基配列解析

1mlの血液からGFX Genomic Blood DNA Purification Kit (アマシャム バイオサイエンス社製) を用いてDNAを抽出することができる。得られる14～16  $\mu\text{g}$ のDNAのうち、250ngを鋳型として、各種プライマー (下記表 1 参照) によりコンドロイチン硫酸合成酵素 (K3、K11、 $\beta 4\text{Gal-T7}$ ) 遺伝子のエクソンを増幅する。このようにして得られる断片を鋳型にして、常法により塩基配列を解析し、それを健全な各コンドロイチン合成酵素の遺伝子の塩基配列を対比することで、変異や塩基多型の有無を容易に調べることができる。

#### 【 0 0 6 3 】

【表 1】

	エキソン増幅用		塩基配列解析用
	5' プライマー	3' プライマー	
K3 (Exon1)	配列番号 16	配列番号 17	配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19
K3 (Exon2)	配列番号 20	配列番号 21	配列番号 20、配列番号 21
K3 (Exon3)	配列番号 22	配列番号 23	配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31
K11 (Exon1)	配列番号 32	配列番号 33	配列番号 32、配列番号 33
K11 (Exon2)	配列番号 34	配列番号 35	配列番号 34、配列番号 35
K11 (Exon3)	配列番号 36	配列番号 37	配列番号 36、配列番号 37
K11 (Exon4)	配列番号 38	配列番号 39	配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43
$\beta$ 4Gal-T7 (Exon1)	配列番号 44	配列番号 45	配列番号 44、配列番号 45
$\beta$ 4Gal-T7 (Exon2)	配列番号 46	配列番号 47	配列番号 46、配列番号 47
$\beta$ 4Gal-T7 (Exon3)	配列番号 48	配列番号 49	配列番号 48、配列番号 49
$\beta$ 4Gal-T7 (Exon4)	配列番号 50	配列番号 51	配列番号 50、配列番号 51
$\beta$ 4Gal-T7 (Exon5)	配列番号 52	配列番号 53	配列番号 52、配列番号 53
$\beta$ 4Gal-T7 (Exon6)	配列番号 54	配列番号 55	配列番号 54、配列番号 55

## 【0064】

## 実施例 2 血液サンプルからのRNA抽出と発現量解析

10mlの血液を3,000rpmで10分間遠心分離し、中間層を分取する。さらに、Lympho Prep (Nycomed社) を用いて遠心分離し中間層を分取する。この操作により末梢血中の単核球 (PBMC)  $9 \times 10^7$  細胞を得る。全量のPBMCからRNA Extraction Kit (アマシャム バイオサイエンス社製) を用いて総RNAを調製することができる。総RNA 10ngからSUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェン社製) により1st strand cDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして、real-time PCR法により各遺伝子の発現量を定量することができる。使用するプライマー及びプローブを表2に示す。

## 【0065】

【表 2】

	5' プライマー	3' プライマー	プローブ
K3	配列番号 56	配列番号 57	配列番号 58
K11	配列番号 59	配列番号 60	配列番号 61
$\beta$ 4Gal-T7	配列番号 62	配列番号 63	配列番号 64

## 【0066】

## 実施例 3 病態モデルマウスの調製

ノックアウトマウスはマウスのK3 (mK3: 配列番号 65)、K11 (mK11: 配列番号 67) あるいは $\beta$ 4Gal-T7 (m $\beta$ 4Gal-T7: 配列番号 69) の活性化ドメインを含むexon (mK3の場合にはORF部分の3番目のexon (1560bp) を含む約10kb断片、mK11の場合にはORF全長に相当する4598bpを含む約10 kb断片、m $\beta$ 4Gal-T7の場合にはORFの2から6番目のexonを含む約10 kb断片) を中心とした染色体断片 (約10 kb) を挿入した直鎖状ターゲティングベクター80  $\mu$ gをES細胞 (E14 / 129Sv マウス由来) にトランスフェクション (エレクトロポレーション) し、G418耐性のコロニーを選択する。G418耐性コロニーを24ウェルプレートに移し、培養を行う。細胞の一部を凍結保存した後、残りのES細胞からDNAを抽出し、PCRにより組み換えが起こっているクローンを120コロニー程度選択する。さらに、サザンブロットティングにより組換が予定通り起こっていることを確認し、最終的に組換体を10クローン程度選択する。選択したうちの2クローンのES細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞内に注入する。ES細胞を注入したマウス胚を仮親マウスの子宮内へ移植してキメラマウスを誕生させる。その後、ジャームトランスミッションによりヘテロノックアウトマウスを得る。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
AMERSHAM BIOSCIENCE K.K.  
SEIKAGAKU CORPORATION

<120> A METHOD FOR DETECTING OF PAGET DISEASE OF BONE

<130> J200202500

<160> 70

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2649

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2649)

<223>

<400> 1

atg gct gtg cgc tct cgc cgc ccg tgg atg agc gtg gca tta ggg ctg 48  
Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Met Ser Val Ala Leu Gly Leu  
1 5 10 15

gtg ctg ggc ttc acc gcc gcg tcc tgg ctc atc gcc ccc agg gtg gcg 96  
Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala  
20 25 30

gag ctg agc gag agg aag aga cgt ggc tcc agc ctc tgc tcc tac tac 144  
Glu Leu Ser Glu Arg Lys Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr  
35 40 45

ggt cgc tct gct gct ggc ccc cgc gcc ggc gct cag cag ccg ctc ccc 192

Gly Arg Ser Ala Ala Gly Pro Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Leu Pro

50

55

60

cag ccc cag tcc cga cca cgg cag gag cag tcg ccg ccc ccc gcg cgc 240

Gln Pro Gln Ser Arg Pro Arg Gln Glu Gln Ser Pro Pro Pro Ala Arg

65

70

75

80

cag gat ctc cag ggg cca ccg ctg ccc gag gca gca ccc ggg atc acc 288

Gln Asp Leu Gln Gly Pro Pro Leu Pro Glu Ala Ala Pro Gly Ile Thr

85

90

95

agt ttt cga agc agc ccc tgg cag cag cca cct ccg ctg cag cag cgg 336

Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Pro Pro Leu Gln Gln Arg

100

105

110

cgg cga gga cgc gag cct gag ggc gcg acg ggg ctt ccc ggt gct cca 384

Arg Arg Gly Arg Glu Pro Glu Gly Ala Thr Gly Leu Pro Gly Ala Pro

115

120

125

gcg gcc gag ggg gag ccc gag gag gag gac ggg ggc gcg gct ggg cag 432

Ala Ala Glu Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Gly Gln

130

135

140

cgg aga gac ggc cgg ccg ggg agt agc cac aac ggc agc ggg gac ggg 480

Arg Arg Asp Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly

145

150

155

160

ggc gct gcc gcc ccg agc gcc cga ccc cgg gac ttc ctg tac gtg ggg 528  
Gly Ala Ala Ala Pro Ser Ala Arg Pro Arg Asp Phe Leu Tyr Val Gly  
165 170 175

gtg atg acc gcg cag aag tac ctg ggc agc cgc gcg ctg gcc gcg cag 576  
Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln  
180 185 190

cgg acc tgg gcg cgt ttc atc ccg ggc cgc gtg gag ttc ttt tcc agc 624  
Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser  
195 200 205

cag cag ccc ccc aac gcc ggc cag ccc ccg cca ccc ctg cct gtc atc 672  
Gln Gln Pro Pro Asn Ala Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro Val Ile  
210 215 220

gcg cta ccg ggt gtg gac gac tcc tat cct ccc cag aaa aag tcc ttc 720  
Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys Ser Phe  
225 230 235 240

atg atg atc aag tac atg cac gac cac tac ctg gac aag tat gag tgg 768  
Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr Glu Trp  
245 250 255

ttc atg cgc gcc gac gac gat gtc tac atc aaa ggt gat aaa tta gaa 816  
Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys Leu Glu  
260 265 270

gag ttt ctt aga tcg cta aac agc agt aag cct ctc tac ctg gga cag 864



Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu Gly Gln  
 275 280 285

act ggc ctg ggg aat att gaa gag ctt gga aag ctg gga ctg gag cct 912  
 Thr Gly Leu Gly Asn Ile Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu Glu Pro  
 290 295 300

ggg gaa aac ttc tgt atg gga gga cct ggc atg atc ttt agc cga gaa 960  
 Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser Arg Glu  
 305 310 315 320

gtt ctc agg agg atg gtg cca cat att ggt gaa tgc ctt aga gaa atg 1008  
 Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg Glu Met  
 325 330 335

tac acg act cat gag gat gtg gaa gta gga aga tgc gtt cgc cgt ttt 1056  
 Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg Arg Phe  
 340 345 350

ggt ggg act cag tgt gtc tgg tct tac gag atg caa caa ctg ttc cat 1104  
 Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu Phe His  
 355 360 365

gaa aat tat gaa cac aat cgg aag ggt tac atc caa gac ctt cac aat 1152  
 Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu His Asn  
 370 375 380

agc aaa atc cat gca gcc ata aca ctt cat ccc aac aaa agg cct gca 1200  
 Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg Pro Ala

385	390	395	400	
tac caa tac agg ctg cat aat tac atg ctc agc cgc aaa att tct gaa				1248
Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu				
	405	410	415	
ctt cgc tac cgc acc atc cag ctc cac agg gaa agt gcc ctg atg agc				1296
Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu Met Ser				
	420	425	430	
aag ctc agt aac aca gaa gtg agc aaa gag gac cag cag ctg gga gtg				1344
Lys Leu Ser Asn Thr Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu Gly Val				
	435	440	445	
ata cct tct ttc aac cac ttc cag cct cgg gag aga aat gaa gtg ata				1392
Ile Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu Val Ile				
	450	455	460	
gaa tgg gag ttc ctg aca ggg aag ctt cta tac tca gca gct gag aac				1440
Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala Glu Asn				
465	470	475	480	
cag ccc cct cga cag agc ctc agt agc att tta aga aca gca ctg gat				1488
Gln Pro Pro Arg Gln Ser Leu Ser Ser Ile Leu Arg Thr Ala Leu Asp				
	485	490	495	
gat acc gtc cta cag gtg atg gag atg atc aat gag aat gcc aag agc				1536
Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala Lys Ser				
	500	505	510	

aga gga cgg ctc att gac ttc aag gaa att cag tat ggc tac cgc aga 1584

Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr Arg Arg

515

520

525

gtt aac ccc atg cac ggg gtg gag tac att ttg gat tta ctc ctt tta 1632

Val Asn Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu Leu Leu

530

535

540

tac aaa aga cac aag gga agg aaa ctg act gtg cca gtg aga cgt cat 1680

Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg Arg His

545

550

555

560

gcc tat ctt cag cag ttg ttc agc aag cct ttc ttc aga gag acc gaa 1728

Ala Tyr Leu Gln Gln Leu Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu Thr Glu

565

570

575

gag cta gat gtc aac agt ctt gtg gag agt att aac agt gaa act cag 1776

Glu Leu Asp Val Asn Ser Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Glu Thr Gln

580

585

590

tca ttc tcc ttt ata tct aat tct tta aag ata tta tct tct ttt caa 1824

Ser Phe Ser Phe Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser Phe Gln

595

600

605

ggt gcc aaa gaa atg gga ggg cac aat gaa aag aaa gta cac att ctc 1872

Gly Ala Lys Glu Met Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His Ile Leu

610

615

620

gtt cct ctc atc gga agg tat gac att ttc ttg aga ttc atg gag aac 1920  
Val Pro Leu Ile Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met Glu Asn  
625 630 635 640

ttt gaa aac atg tgt ctt atc cca aag cag aat gta aag ttg gtc att 1968  
Phe Glu Asn Met Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu Val Ile  
645 650 655

atc ctt ttc agt agg gat tct ggc caa gac tcc agc aag cat att gag 2016  
Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ser Gly Gln Asp Ser Ser Lys His Ile Glu  
660 665 670

ctg ata aaa ggg tac cag aac aag tac ccc aaa gca gaa atg acc ctg 2064  
Leu Ile Lys Gly Tyr Gln Asn Lys Tyr Pro Lys Ala Glu Met Thr Leu  
675 680 685

atc cca atg aag gga gag ttt tcc aga ggt ctt ggt ctt gaa atg gct 2112  
Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu Met Ala  
690 695 700

tct gcc cag ttt gac aat gac act ttg ctg cta ttt tgt gat gtt gac 2160  
Ser Ala Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp Val Asp  
705 710 715 720

ttg atc ttc aga gaa gat ttt ctc caa cga tgt aga gac aat aca att 2208  
Leu Ile Phe Arg Glu Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn Thr Ile  
725 730 735

cag gga caa cag gtg tac tat ccc atc atc ttt agc cag tat gac cca 2256

Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr Asp Pro  
 740 745 750

aag gta aca aac ggg gga aat cct ccc act gat ggt tac ttc ata ttc 2304  
 Lys Val Thr Asn Gly Gly Asn Pro Pro Thr Asp Gly Tyr Phe Ile Phe  
 755 760 765

tca aaa aag act gga ttt tgg aga gac tat gga tat ggc atc acc tgt 2352  
 Ser Lys Lys Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile Thr Cys  
 770 775 780

att tac aaa agt gat ctt cta ggt gca ggt gga ttt gat acc tca ata 2400  
 Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr Ser Ile  
 785 790 795 800

caa ggc tgg gga cta gaa gat gta gat ctc tac aat aaa gtc att cta 2448  
 Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val Ile Leu  
 805 810 815

tct ggc tta agg cca ttc aga agc caa gaa gta gga gtg gtg cat att 2496  
 Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val His Ile  
 820 825 830

ttc cat cca gtt cat tgt gat cct aac ttg gac cct aag cag tat aag 2544  
 Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln Tyr Lys  
 835 840 845

atg tgc tta gga tcc aag gca agt act ttc gcc tca acc atg caa ctg 2592  
 Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met Gln Leu

850

855

860

gct gaa ctc tgg ctt gaa aaa cat tta ggt gtc agg tac aat cga act 2640

Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Tyr Asn Arg Thr

865

870

875

880

ctc tcc tga

2649

Leu Ser

<210> 2

<211> 882

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Met Ser Val Ala Leu Gly Leu

1

5

10

15

Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala

20

25

30

Glu Leu Ser Glu Arg Lys Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr

35

40

45

Gly Arg Ser Ala Ala Gly Pro Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Leu Pro  
50 55 60

Gln Pro Gln Ser Arg Pro Arg Gln Glu Gln Ser Pro Pro Pro Ala Arg  
65 70 75 80

Gln Asp Leu Gln Gly Pro Pro Leu Pro Glu Ala Ala Pro Gly Ile Thr  
85 90 95

Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Pro Pro Leu Gln Gln Arg  
100 105 110

Arg Arg Gly Arg Glu Pro Glu Gly Ala Thr Gly Leu Pro Gly Ala Pro  
115 120 125

Ala Ala Glu Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Gly Gln  
130 135 140

Arg Arg Asp Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly  
145 150 155 160

Gly Ala Ala Ala Pro Ser Ala Arg Pro Arg Asp Phe Leu Tyr Val Gly  
165 170 175

Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln  
180 185 190

Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser  
195 200 205

Gln Gln Pro Pro Asn Ala Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro Val Ile  
210 215 220

Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys Ser Phe  
225 230 235 240

Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr Glu Trp  
245 250 255

Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys Leu Glu  
260 265 270

Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu Gly Gln



275

280

285

Thr Gly Leu Gly Asn Ile Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu Glu Pro

290

295

300

Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser Arg Glu

305

310

315

320

Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg Glu Met

325

330

335

Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg Arg Phe

340

345

350

Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu Phe His

355

360

365

Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu His Asn

370

375

380

Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg Pro Ala

385

390

395

400

Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu

405

410

415

Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu Met Ser

420

425

430

Lys Leu Ser Asn Thr Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu Gly Val

435

440

445

Ile Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu Val Ile

450

455

460

Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala Glu Asn

465

470

475

480

Gln Pro Pro Arg Gln Ser Leu Ser Ser Ile Leu Arg Thr Ala Leu Asp

485

490

495

Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala Lys Ser

500

505

510

Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr Arg Arg  
515 520 525

Val Asn Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu Leu Leu  
530 535 540

Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg Arg His  
545 550 555 560

Ala Tyr Leu Gln Gln Leu Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu Thr Glu  
565 570 575

Glu Leu Asp Val Asn Ser Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Glu Thr Gln  
580 585 590

Ser Phe Ser Phe Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser Phe Gln  
595 600 605

Gly Ala Lys Glu Met Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His Ile Leu  
610 615 620

Val Pro Leu Ile Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met Glu Asn  
625 630 635 640

Phe Glu Asn Met Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu Val Ile  
645 650 655

Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ser Gly Gln Asp Ser Ser Lys His Ile Glu  
660 665 670

Leu Ile Lys Gly Tyr Gln Asn Lys Tyr Pro Lys Ala Glu Met Thr Leu  
675 680 685

Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu Met Ala  
690 695 700

Ser Ala Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp Val Asp  
705 710 715 720

Leu Ile Phe Arg Glu Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn Thr Ile  
725 730 735

Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr Asp Pro

740

745

750

Lys Val Thr Asn Gly Gly Asn Pro Pro Thr Asp Gly Tyr Phe Ile Phe

755

760

765

Ser Lys Lys Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile Thr Cys

770

775

780

Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr Ser Ile

785

790

795

800

Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val Ile Leu

805

810

815

Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val His Ile

820

825

830

Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln Tyr Lys

835

840

845

Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met Gln Leu

850

855

860

Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Tyr Asn Arg Thr

865

870

875

880

Leu Ser

<210> 3

<211> 2328

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2328)

<223>

<400> 3

atg cgg gca tcg ctg ctg ctg tcg gtg ctg cgg ccc gca ggg ccc gtg 48

Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val

1

5

10

15

gcc gtg ggc atc tcc ctg ggc ttc acc ctg agc ctg ctc agc gtc acc 96

Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr

20

25

30

tgg gtg gag gag ccg tgc ggc cca ggc ccg ccc caa cct gga gac tct 144  
 Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser

35

40

45

gag ctg ccg ccg cgc ggc aac acc aac gcg gcg cgc cgg ccc aac tcg 192  
 Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser

50

55

60

gtg cag ccc gga gcg gag cgc gag aag ccc ggg gcc ggc gaa ggc gcc 240  
 Val Gln Pro Gly Ala Glu Arg Glu Lys Pro Gly Ala Gly Glu Gly Ala

65

70

75

80

ggg gag aat tgg gag ccg cgc gtc ttg ccc tac cac cct gca cag ccc 288  
 Gly Glu Asn Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro

85

90

95

ggc cag gcc gcc aaa aag gcc gtc agg acc cgc tac atc agc acg gag 336  
 Gly Gln Ala Ala Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu

100

105

110

ctg ggc atc agg cag agg ctg ctg gtg gcg gtg ctg acc tct cag acc 384  
 Leu Gly Ile Arg Gln Arg Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Thr

115

120

125

acg ctg ccc acg ctg ggc gtg gcc gtg aac cgc acg ctg ggg cac cgg 432  
 Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg

130

135

140

ctg gag cgt gtg gtg ttc ctg acg ggc gca cgg ggc cgc cgg gcc cca 480

Leu Glu Arg Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Ala Pro  
 145 150 155 160

cct ggc atg gca gtg gtg acg ctg ggc gag gag cga ccc att gga cac 528  
 Pro Gly Met Ala Val Val Thr Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His  
 165 170 175

ctg cac ctg gcg ctg cgc cac ctg ctg gag cag cac ggc gac gac ttt 576  
 Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe  
 180 185 190

gac tgg ttc ttc ctg gtg cct gac acc acc tac acc gag gcg cac ggc 624  
 Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Thr Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly  
 195 200 205

ctg gca cgc cta act ggc cac ctc agc ctg gcc tcc gcc gcc cac ctg 672  
 Leu Ala Arg Leu Thr Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Ala His Leu  
 210 215 220

tac ctg ggc cgg ccc cag gac ttc atc ggc gga gag ccc acc ccc ggc 720  
 Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Glu Pro Thr Pro Gly  
 225 230 235 240

cgc tac tgc cac gga ggc ttt ggg gtg ctg ctg tcg cgc atg ctg ctg 768  
 Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Met Leu Leu  
 245 250 255

caa caa ctg cgc ccc cac ctg gaa ggc tgc cgc aac gac atc gtc agt 816  
 Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Gly Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser



260

265

270

gcg cgc cct gac gag tgg ctg ggt cgc tgc att ctc gat gcc acc ggg 864

Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly

275

280

285

gtg ggc tgc act ggt gac cac gag ggg gtg cac tat agc cat ctg gag 912

Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Val His Tyr Ser His Leu Glu

290

295

300

ctg agc cct ggg gag cca gtg cag gag ggg gac cct cat ttc cga agt 960

Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro His Phe Arg Ser

305

310

315

320

gcc ctg aca gcc cac cct gtg cgt gac cct gtg cac atg tac cag ctg 1008

Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu

325

330

335

cac aaa gct ttc gcc cga gct gaa ctg gaa cgc acg tac cag gag atc 1056

His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Glu Arg Thr Tyr Gln Glu Ile

340

345

350

cag gag tta cag tgg gag atc cag aat acc agc cat ctg gcc gtt gat 1104

Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser His Leu Ala Val Asp

355

360

365

ggg gac cgg gca gct gct tgg ccc gtg ggt att cca gca cca tcc cgc 1152

Gly Asp Arg Ala Ala Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg

370

375

380

ccg gcc tcc cgc ttt gag gtg ctg cgc tgg gac tac ttc acg gag cag 1200

Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln

385 390 395 400

cac gct ttc tcc tgc gcc gat ggc tca ccc cgc tgc cca ctg cgt ggg 1248

His Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly

405 410 415

gct gac cgg gct gat gtg gcc gat gtt ctg ggg aca gct cta gag gag 1296

Ala Asp Arg Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu

420 425 430

ctg aac cgc cgc tac cac ccg gcc ttg cgg ctc cag aag cag cag ctg 1344

Leu Asn Arg Arg Tyr His Pro Ala Leu Arg Leu Gln Lys Gln Gln Leu

435 440 445

gtg aat ggc tac cga cgc ttt gat ccg gcc cgg ggt atg gaa tac acg 1392

Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr

450 455 460

ctg gac ttg cag ctg gag gca ctg acc ccc cag gga ggc cgc cgg ccc 1440

Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Arg Pro

465 470 475 480

ctc act cgc cga gtg cag ctg ctc cgg ccg ctg agc cgc gtg gag atc 1488

Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile

485 490 495

ttg cct gtg ccc tat gtc act gag gcc tca cgt ctc act gtg ctg ctg 1536  
 Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu  
 500 505 510

cct cta gct gcg gct gag cgt gac ctg gcc cct ggc ttc ttg gag gcc 1584  
 Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Pro Gly Phe Leu Glu Ala  
 515 520 525

ttt gcc act gca gca ctg gag cct ggt gat gct gcg gca gcc ctg acc 1632  
 Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Leu Thr  
 530 535 540

ctg ctg cta ctg tat gag ccg cgc cag gcc cag cgc gtg gcc cat gca 1680  
 Leu Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Val Ala His Ala  
 545 550 555 560

gat gtc ttc gca cct gtc aag gcc cac gtg gca gag ctg gag cgg cgt 1728  
 Asp Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg  
 565 570 575

ttc ccc ggt gcc cgg gtg cca tgg ctc agt gtg cag aca gcc gca ccc 1776  
 Phe Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro  
 580 585 590

tca cca ctg cgc ctc atg gat cta ctc tcc aag aag cac ccg ctg gac 1824  
 Ser Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp  
 595 600 605

aca ctg ttc ctg ctg gcc ggg cca gac acg gtg ctc acg cct gac ttc 1872

Thr Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe  
 610 615 620

ctg aac cgc tgc cgc atg cat gcc atc tcc ggc tgg cag gcc ttc ttt 1920  
 Leu Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe  
 625 630 635 640

ccc atg cat ttc caa gcc ttc cac cca gct gtg gcc cca cca caa ggg 1968  
 Pro Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly  
 645 650 655

cct ggg ccc cca gag ctg ggc cgt gac act ggc cgc ttt gat cgc cag 2016  
 Pro Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly Arg Phe Asp Arg Gln  
 660 665 670

gca gcc agc gag gcc tgc ttc tac aac tcc gac tac gtg gca gcc cgt 2064  
 Ala Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg  
 675 680 685

ggg cgc ctg gcg gca gcc tca gaa caa gaa gag gag ctg ctg gag agc 2112  
 Gly Arg Leu Ala Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser  
 690 695 700

ctg gat gtg tac gag ctg ttc ctc cac ttc tcc agt ctg cat gtg ctg 2160  
 Leu Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu His Phe Ser Ser Leu His Val Leu  
 705 710 715 720

cgg gcg gtg gag ccg gcg ctg ctg cag cgc tac cgg gcc cag acg tgc 2208  
 Arg Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Thr Cys

725

730

735

agc gcg agg ctc agt gag gac ctg tac cac cgc tgc ctc cag agc gtg 2256

Ser Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Leu Gln Ser Val

740

745

750

ctt gag ggc ctc ggc tcc cga acc cag ctg gcc atg cta ctc ttt gaa 2304

Leu Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu

755

760

765

cag gag cag ggc aac agc acc tga 2328

Gln Glu Gln Gly Asn Ser Thr

770

775

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 775

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val

1

5

10

15

Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr

20

25

30

Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser

35

40

45

Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser

50

55

60

Val Gln Pro Gly Ala Glu Arg Glu Lys Pro Gly Ala Gly Glu Gly Ala

65

70

75

80

Gly Glu Asn Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro

85

90

95

Gly Gln Ala Ala Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu

100

105

110

Leu Gly Ile Arg Gln Arg Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Thr

115

120

125

Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg

130

135

140

Leu Glu Arg Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Ala Pro  
145 150 155 160

Pro Gly Met Ala Val Val Thr Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His  
165 170 175

Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe  
180 185 190

Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Thr Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly  
195 200 205

Leu Ala Arg Leu Thr Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Ala His Leu  
210 215 220

Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Glu Pro Thr Pro Gly  
225 230 235 240

Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Met Leu Leu  
245 250 255

Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Gly Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser

260

265

270

Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly

275

280

285

Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Val His Tyr Ser His Leu Glu

290

295

300

Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro His Phe Arg Ser

305

310

315

320

Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu

325

330

335

His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Glu Arg Thr Tyr Gln Glu Ile

340

345

350

Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser His Leu Ala Val Asp

355

360

365

Gly Asp Arg Ala Ala Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg

370

375

380



Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln  
385 390 395 400

His Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly  
405 410 415

Ala Asp Arg Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu  
420 425 430

Leu Asn Arg Arg Tyr His Pro Ala Leu Arg Leu Gln Lys Gln Gln Leu  
435 440 445

Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr  
450 455 460

Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Arg Pro  
465 470 475 480

Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile  
485 490 495

Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu  
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Pro Gly Phe Leu Glu Ala  
515 520 525

Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Leu Thr  
530 535 540

Leu Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Val Ala His Ala  
545 550 555 560

Asp Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg  
565 570 575

Phe Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro  
580 585 590

Ser Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp  
595 600 605

Thr Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe  
610 615 620

Leu Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe  
625 630 635 640

Pro Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly  
645 650 655

Pro Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly Arg Phe Asp Arg Gln  
660 665 670

Ala Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg  
675 680 685

Gly Arg Leu Ala Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser  
690 695 700

Leu Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu His Phe Ser Ser Leu His Val Leu  
705 710 715 720

Arg Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Thr Cys

725

730

735

Ser Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Leu Gln Ser Val

740

745

750

Leu Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu

755

760

765

Gln Glu Gln Gly Asn Ser Thr

770

775

<210> 5

<211> 1669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1024)

<223>

<400> 5

ctgcgagcgc ctgccccatg cgccgccgcc tctccgcacg atg ttc ccc tcg cgg 55

Met Phe Pro Ser Arg

1

5

agg aaa gcg gcg cag ctg ccc tgg gag gac ggc agg tcc ggg ttg ctc 103

Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly Arg Ser Gly Leu Leu

10

15

20

tcc ggc ggc ctc cct cgg aag tgt tcc gtc ttc cac ctg ttc gtg gcc 151

Ser Gly Gly Leu Pro Arg Lys Cys Ser Val Phe His Leu Phe Val Ala

25

30

35

tgc ctc tcg ctg ggc ttc ttc tcc cta ctc tgg ctg cag ctc agc tgc 199

Cys Leu Ser Leu Gly Phe Phe Ser Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ser Cys

40

45

50

tct ggg gac gtg gcc cgg gca gtc agg gga caa ggg cag gag acc tcg 247

Ser Gly Asp Val Ala Arg Ala Val Arg Gly Gln Gly Gln Glu Thr Ser

55

60

65

ggc cct ccc cgc gcc tgc ccc cca gag ccg ccc cct gag cac tgg gaa 295

Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro Pro Glu His Trp Glu

70

75

80

85

gaa gac gca tcc tgg ggc ccc cac cgc ctg gca gtg ctg gtg ccc ttc 343

Glu Asp Ala Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala Val Leu Val Pro Phe

90

95

100

cgc gaa cgc ttc gag gag ctc ctg gtc ttc gtg ccc cac atg cgc cgc 391

Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val Pro His Met Arg Arg

105

110

115

ttc ctg agc agg aag aag atc cgg cac cac atc tac gtg ctc aac cag 439  
Phe Leu Ser Arg Lys Lys Ile Arg His His Ile Tyr Val Leu Asn Gln

120

125

130

gtg gac cac ttc agg ttc aac cgg gca gcg ctc atc aac gtg ggc ttc 487  
Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu Ile Asn Val Gly Phe

135

140

145

ctg gag agc agc aac agc acg gac tac att gcc atg cac gac gtt gac 535  
Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala Met His Asp Val Asp

150

155

160

165

ctg ctc cct ctc aac gag gag ctg gac tat ggc ttt cct gag gct ggg 583  
Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly Phe Pro Glu Ala Gly

170

175

180

ccc ttc cac gtg gcc tcc ccg gag ctc cac cct ctc tac cac tac aag 631  
Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro Leu Tyr His Tyr Lys

185

190

195

acc tat gtc ggc ggc atc ctg ctg ctc tcc aag cag cac tac cgg ctg 679  
Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys Gln His Tyr Arg Leu

200

205

210

tgc aat ggg atg tcc aac cgc ttc tgg ggc tgg ggc cgc gag gac gac 727  
Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp Gly Arg Glu Asp Asp

215

220

225

gag ttc tac cgg cgc att aag gga gct ggg ctc cag ctt ttc cgc ccc 775

Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu Gln Leu Phe Arg Pro  
 230 235 240 245

tcg gga atc aca act ggg tac aag aca ttt cgc cac ctg cac gac cca 823  
 Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Phe Arg His Leu His Asp Pro  
 250 255 260

gcc tgg cgg aag agg gac cag aag cgc atc gca gct caa aaa cag gag 871  
 Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala Ala Gln Lys Gln Glu  
 265 270 275

cag ttc aag gtg gac agg gag gga ggc ctg aac act gtg aag tac cat 919  
 Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn Thr Val Lys Tyr His  
 280 285 290

gtg gct tcc cgc act gcc ctg tct gtg ggc ggg gcc ccc tgc act gtc 967  
 Val Ala Ser Arg Thr Ala Leu Ser Val Gly Gly Ala Pro Cys Thr Val  
 295 300 305

ctc aac atc atg ttg gac tgt gac aag acc gcc aca ccc tgg tgc aca 1015  
 Leu Asn Ile Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala Thr Pro Trp Cys Thr  
 310 315 320 325

ttc agc tga gctggatgga cagtgaggaa gcctgtacct acaggccata 1064  
 Phe Ser

ttgctcaggc tcaggacaag gcctcaggtc gtgggccag ctctgacagg atgtggagtg 1124

gccaggacca agacagcaag ctacgcaatt gcagccaccc ggccgccaag gcaggcttgg 1184  
gctgggccag gacacgtggg gtgcctggga cgctgcttgc catgcacagt gatcagagag 1244  
aggctgggggt gtgtcctgtc cgggaccccc cctgccttcc tgctcacctt actctgacct 1304  
ccttcacgtg cccaggcctg tgggtagtgg ggagggtga acaggacaac ctctcatcac 1364  
ccccactttt gtctcttctt gctgggctgc ctctgacaga gacacagtgt aggggccatg 1424  
cagctggcgt aggtggcagt tgggcctggg gagggtagg acttcagaaa ccagagcaca 1484  
agccccacag agggggaaca gccagcaccg ctctagctgg ttgttgccat gccggaatgt 1544  
gggcctagtg ttgccagatc ttctgatttt tcgaaagaaa ctagaatgct ggattcttaa 1604  
gtgatatctt ctgatttttt aaatgatagc acctaaatga aactttcaaa aagtaaaaaa 1664  
aaaaa 1669

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe Pro Ser Arg Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly



1

5

10

15

Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Gly Leu Pro Arg Lys Cys Ser Val Phe  
20 25 30

His Leu Phe Val Ala Cys Leu Ser Leu Gly Phe Phe Ser Leu Leu Trp  
35 40 45

Leu Gln Leu Ser Cys Ser Gly Asp Val Ala Arg Ala Val Arg Gly Gln  
50 55 60

Gly Gln Glu Thr Ser Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro  
65 70 75 80

Pro Glu His Trp Glu Glu Asp Ala Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala  
85 90 95

Val Leu Val Pro Phe Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val  
100 105 110

Pro His Met Arg Arg Phe Leu Ser Arg Lys Lys Ile Arg His His Ile  
115 120 125

Tyr Val Leu Asn Gln Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu  
130 135 140

Ile Asn Val Gly Phe Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala  
145 150 155 160

Met His Asp Val Asp Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly  
165 170 175

Phe Pro Glu Ala Gly Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro  
180 185 190

Leu Tyr His Tyr Lys Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys  
195 200 205

Gln His Tyr Arg Leu Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp  
210 215 220

Gly Arg Glu Asp Asp Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu  
225 230 235 240

Gln Leu Phe Arg Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Lys Thr Phe Arg  
245 250 255

His Leu His Asp Pro Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala  
260 265 270

Ala Gln Lys Gln Glu Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn  
275 280 285

Thr Val Lys Tyr His Val Ala Ser Arg Thr Ala Leu Ser Val Gly Gly  
290 295 300

Ala Pro Cys Thr Val Leu Asn Ile Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala  
305 310 315 320

Thr Pro Trp Cys Thr Phe Ser  
325

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K3)

<400> 7

cccaagcttg ccgaggggga gcccga

26

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K3)

<400> 8

gctctagact gtcaggagag agttcgatt

29

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K3)

<400> 9

atggctgtgc gctctcgccg cccgt

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K3)

<400> 10

cgtcccgct gccgttgtgg ctact

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K3)

<400> 11

agtagccaca acggcagcgg ggacg

25

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K3)

<400> 12

tcaggagaga gttcgattgt acct

24

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR (K11)

<400> 13

ggaattccgg ccaggccgcc aaaaaggc

28

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR (K11)

&lt;400&gt; 14

cgggatacctc aggtgctgtt gccctgctcc

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthesised substance for assay

&lt;400&gt; 15

Val Leu Pro Gln Glu Glu Glu Gly Ser Gly Gly Gly Gln Leu Val Thr

1

5

10

15

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K3 exon 1)

<400> 16

cgacagccca gcgagcgtcc

20

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K3 exon 1)

<400> 17

ggagactggc aggctggaaa gc

22

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 1)

<400> 18

aggggggagcc cgaggaggag

20



<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 1)

<400> 19

ctcctcctcg ggctccccct

20

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K3 exon 2)

<400> 20

gagacatagt aattgttgcc tttcttt

27

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K3 exon 2)

<400> 21

gtgaacattt tcatcacagc tccat

25

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K3 exon 3)

<400> 22

tagatgcttt agtttatcgc tggttt

26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K3 exon 3)

<400> 23

ttaaaaaagg caaatgtgt tgcctg

26

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 24

tctataactca gcagctgaga acca

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 25

tggttctcag ctgctgagta taga

24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 26

gaaatgggag ggcacaatga aaag

24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 27

cttttcattg tgccctccca ttct

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 28

tagccagtat gacccaaagg taac

24

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 29

gttacctttg ggtcatactg gcta

24

<210> 30

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 30

aggccattca gaagccaaga agtaggagtg g

31

<210> 31

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K3 exon 3)

<400> 31

ccactcctac ttcttggtt ctgaatggcc t

31

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (Kl1 exon 1)

<400> 32

tcggagactc ctctggctgc t

21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (Kl1 exon 1)

<400> 33

tagagcgggc gcagccgatc a

21

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing

ing (K11 exon 2)

<400> 34

tttgataagc ttgtgccatc tcctc

25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 2)

<400> 35

aggtatcagt gggatagctt atcat

25

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K11 exon 3)

<400> 36



agctcatcac agatcccttc cctt

24

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 1)

<400> 37

actctgccac ccccagacct ag

22

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (K11 exon 4)

<400> 38

ttgctgatgg cctgtttctc tgat

24

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (K11 exon 4)

<400> 39

gtgtggccat gccacggccc a

21

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K11 exon 4)

<400> 40

tatgtcactg aggcctcacg tct

23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K11 ex  
on 4)

<400> 41

agacgtgagg cctcagtgac ata

23

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for sequencing (K11 ex  
on 4)

<400> 42

atgcatttcc aagccttcca ccca

24

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer for sequencing (K11 exon 4)

<400> 43

tgggtggaag gcttggaat gcat

24

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 1)

<400> 44

tgcgagcgcc tgcccatgc

20

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 1)

<400> 45

gatggcctcg ggttcccaga tt

22

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 2)

<400> 46

tcctgaccct gtcccgcgct t

21

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 2)

<400> 47

aggggtgccg aggggagagg

20

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 3)

<400> 48

ctgcccagcc ttgccaccc t

21

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 3)

<400> 49

gctctgagca gagcaggctg tc

22

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 4)

<400> 50

agatgggccg agtgacgctg ct

22

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 4)

<400> 51

ctcagggcag ccaccgcagc t

21

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 5)

<400> 52

aagggcagcc tgaccccgac tt

22

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 5)

<400> 53

atgaccacct atccgtcccc aat

23

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 6).



<400> 54

cagccctgag tccgtgctct tt

22

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 6)

<220>

<221> misc\_feature

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for PCR and sequencing (beta4Gal-T7 exon 6)

<400> 55

tggcctgtag gtacaggctt cct

23

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR (K3)

<400> 56

cccagaaaaa gtccttcacg atg

23

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR (K3)

<400> 57

aactcttcta attgtgcacc ttgatgtag

30

<210> 58

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for RT-PCR (K3)

<400> 58

atgagtgggt catgcgc

17

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR (K11)

<400> 59

gctgaactgg aacgcacgta

20

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR (K11)

<400> 60

cgggatggtg ctggaatac

19

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for RT-PCR (K11)

<400> 61

agatccagga gttacagtgg

20

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for RT-PCR (beta4Gal-T7)

<400> 62

cggcgcatta agggagct

18

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for RT-PCR (beta4Gal

1-T7)

<400> 63

taccagttg tgattcccga g

21

<210> 64

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Probe for RT-PCR (beta4Gal-T7  
)

<400> 64

ctccagcttt tccg

14

<210> 65

<211> 2652

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2652)

<223>

&lt;400&gt; 65

atg gcc gtg cgc tcc cgc cgc cca tgg gtg agc gtg gca ttg ggg ttg 48

Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Val Ser Val Ala Leu Gly Leu

1 5 10 15

gtc ctg ggc ttc acc gcc gcg tcc tgg ctc atc gcc ccc cgg gtg gcc 96

Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala

20 25 30

gag ctg agc gag aag agg cga cgc ggc tcc agt ctt tgc tcc tac tac 144

Glu Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr

35 40 45

ggc cgc tcg gct acc ggg ccc cgc gcg gac gcg cag cag ctg ctc ccc 192

Gly Arg Ser Ala Thr Gly Pro Arg Ala Asp Ala Gln Gln Leu Leu Pro

50 55 60

caa ccc cag tcc cgg ccg cgg cta gag cag tcg ccg ccc cct gcc agc 240

Gln Pro Gln Ser Arg Pro Arg Leu Glu Gln Ser Pro Pro Pro Ala Ser

65 70 75 80

cac gag ctc ccc ggt cct cag cag ccg gag gcg gcg ccc gga ggt ccc 288

His Glu Leu Pro Gly Pro Gln Gln Pro Glu Ala Ala Pro Gly Gly Pro

85 90 95

agt ttt cgg agc agc ccc tgg cag cag ccg gct ctg ttg ccg cag agg 336

Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Ala Leu Leu Pro Gln Arg

100 105 110

agg cga gga cac acg ccc gaa ggt gcg acg gcg ctt ccc ggc gct ccg 384

Arg Arg Gly His Thr Pro Glu Gly Ala Thr Ala Leu Pro Gly Ala Pro

115

120

125

gct gcc aaa ggg gaa cca gag gag gag gat ggg ggc gcg gct gac cct 432

Ala Ala Lys Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Asp Pro

130

135

140

cgg aag ggt ggc cgg ccg ggg agc agc cac aac ggc agc ggg gac ggg 480

Arg Lys Gly Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly

145

150

155

160

ggt gcc gct gtc ccg acc tcc gga ccc ggg gac ttc ctg tac gtg ggt 528

Gly Ala Ala Val Pro Thr Ser Gly Pro Gly Asp Phe Leu Tyr Val Gly

165

170

175

gtg atg acc gca cag aag tac ctg ggc agt cgc gcg ctg gcc gcg cag 576

Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln

180

185

190

cgg acc tgg gcg cgc ttc atc cct ggc cgc gtg gag ttc ttt tcc agt 624

Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser

195

200

205

cag caa tct ccc agt gct gcg ctt ggc cag ccc ccg cca cct ttg cct 672

Gln Gln Ser Pro Ser Ala Ala Leu Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro

210

215

220

gtc atc gcg ctg cca ggg gtc gac gat tcc tac cct ccc cag aaa aag 720

Val Ile Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys  
 225 230 235 240

tcc ttc atg atg atc aag tac atg cac gac cac tat ctg gac aag tat 768  
 Ser Phe Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr  
 245 250 255

gag tgg ttc atg cgc gcc gac gac gat gtc tac atc aaa ggt gat aag 816  
 Glu Trp Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys  
 260 265 270

tta gaa gaa ttt cta aga tcc cta aat agc agc aag cct ctc tac ctg 864  
 Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu  
 275 280 285

gga cag acg ggc ctg ggc aat act gaa gaa ctt gga aag ctg ggg ctg 912  
 Gly Gln Thr Gly Leu Gly Asn Thr Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu  
 290 295 300

gag ccc ggg gag aac ttc tgc atg gga gga cct ggc atg atc ttc agc 960  
 Glu Pro Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser  
 305 310 315 320

aga gag gtt ctc agg cgg atg gtg cct cat atc ggc gaa tgc ctc cga 1008  
 Arg Glu Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg  
 325 330 335

gag atg tac acc aca cac gaa gac gta gaa gta gga agg tgt gtt cgc 1056  
 Glu Met Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg



340

345

350

cgt ttc ggc ggg acg cag tgt gtc tgg tct tat gag atg cag cag ctg 1104

Arg Phe Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu

355

360

365

ttc cat gaa aac tac gaa cac aat cgc aag ggt tac atc caa gac ctc 1152

Phe His Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu

370

375

380

cac aac agc aaa atc cac gca gcc atc acg ctc cat ccg aac aaa agg 1200

His Asn Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg

385

390

395

400

ccc gcg tac cag tac aga ctt cat aac tac atg ctc agc cgc aag atc 1248

Pro Ala Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile

405

410

415

tcc gag ctc cgc tac cgc acc atc cag ctc cac cgg gag agc gct ctc 1296

Ser Glu Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu

420

425

430

atg agc aag ctc agc aac agt gaa gtg agc aaa gag gac caa cag ctg 1344

Met Ser Lys Leu Ser Asn Ser Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu

435

440

445

gga agg acg ccg tcc ttc aac cac ttc cag cct cgg gag aga aat gaa 1392

Gly Arg Thr Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu

450

455

460

gtc atg gag tgg gag ttc ctg acg ggg aag ctg ctt tac tca gct gca 1440

Val Met Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala

465 470 475 480

gag aac cag cct cct cga cag agc atc aac agc atc cta agg tca gct 1488

Glu Asn Gln Pro Pro Arg Gln Ser Ile Asn Ser Ile Leu Arg Ser Ala

485 490 495

ctg gat gac act gtc ctg cag gtg atg gag atg atc aac gag aat gcc 1536

Leu Asp Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala

500 505 510

aag agt agg ggc cga ctc atc gac ttc aag gaa att cag tat ggc tac 1584

Lys Ser Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr

515 520 525

cgc agg gtt gat ccc atg cac ggg gtt gag tac ata ttg gac ctg cta 1632

Arg Arg Val Asp Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu

530 535 540

ctc ctg tac aaa agg cac aaa gga agg aaa ctg act gtg cct gtg agg 1680

Leu Leu Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg

545 550 555 560

cgc cat gcc tat ctt cag cag cca ttt agc aag cct ttc ttc aga gag 1728

Arg His Ala Tyr Leu Gln Gln Pro Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu

565 570 575

gtg gaa gaa ctc gac gtc aac cgt ctg gtg gag agt atc aac agc ggt 1776

Val Glu Glu Leu Asp Val Asn Arg Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Gly

580

585

590

aca cag tca ttc tcc gtt ata tcc aat tct cta aaa att ctc tct tct 1824

Thr Gln Ser Phe Ser Val Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser

595

600

605

ctt caa gag gcc aaa gac ata gga ggg cac aat gaa aag aaa gta cac 1872

Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His

610

615

620

att ctc gtt cca ctc gtt gga agg tac gac att ttc ttg aga ttc atg 1920

Ile Leu Val Pro Leu Val Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met

625

630

635

640

gaa aat ttt gaa agt acg tgt ctt atc cca aag caa aat gtc aag ctt 1968

Glu Asn Phe Glu Ser Thr Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu

645

650

655

gtc atc atc ctt ttc agc agg gat gct ggc caa gag tcc atc aag cac 2016

Val Ile Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ala Gly Gln Glu Ser Ile Lys His

660

665

670

att gag ctg ata caa gaa tat cag agc agg tat ccc agt gca gaa atg 2064

Ile Glu Leu Ile Gln Glu Tyr Gln Ser Arg Tyr Pro Ser Ala Glu Met

675

680

685

atg ctc att ccc atg aag gga gag ttt tcc aga ggt ctt ggt ctt gaa 2112

Met Leu Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu  
 690 695 700

atg gct tct tcc cag ttt gac aat gac aca ttg ctg cta ttt tgt gat 2160  
 Met Ala Ser Ser Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp  
 705 710 715 720

gtt gac ttg att ttc aga gga gac ttc ctc caa cgc tgt cga gac aat 2208  
 Val Asp Leu Ile Phe Arg Gly Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn  
 725 730 735

aca gtt cag gga caa cag gta tat tac ccc atc atc ttt agc cag tat 2256  
 Thr Val Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr  
 740 745 750

gac cca aag gtc acc cat atg aga aat cct ccc aca gag ggt gac ttt 2304  
 Asp Pro Lys Val Thr His Met Arg Asn Pro Pro Thr Glu Gly Asp Phe  
 755 760 765

gta ttc tca aag gaa act ggg ttt tgg aga gac tat ggc tac gga atc 2352  
 Val Phe Ser Lys Glu Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile  
 770 775 780

aca tgc att tac aaa agc gat cta ctg ggt gca ggt gga ttt gat acc 2400  
 Thr Cys Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr  
 785 790 795 800

tca ata caa ggc tgg gga ctg gaa gat gta gat ctc tat aat aaa gtc 2448  
 Ser Ile Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val

805

810

815

atc cta tct ggc tta cgg ccc ttc aga agt caa gaa gtg gga gtg gtg 2496

Ile Leu Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val

820

825

830

cat att ttc cat cct gtt cat tgt gat cct aac ttg gac cct aag cag 2544

His Ile Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln

835

840

845

tat aag atg tgc tta gga tcc aaa gca agt act ttt gcc tca acc atg 2592

Tyr Lys Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met

850

855

860

caa ctg gct gaa ctc tgg tta gaa aaa cat ttg ggt gtc agg gat aat 2640

Gln Leu Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Asp Asn

865

870

875

880

cga act ctc tcc 2652

Arg Thr Leu Ser

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 884

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 66

Met Ala Val Arg Ser Arg Arg Pro Trp Val Ser Val Ala Leu Gly Leu

1

5

10

15

Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Ser Trp Leu Ile Ala Pro Arg Val Ala

20

25

30

Glu Leu Ser Glu Lys Arg Arg Arg Gly Ser Ser Leu Cys Ser Tyr Tyr

35

40

45

Gly Arg Ser Ala Thr Gly Pro Arg Ala Asp Ala Gln Gln Leu Leu Pro

50

55

60

Gln Pro Gln Ser Arg Pro Arg Leu Glu Gln Ser Pro Pro Pro Ala Ser

65

70

75

80

His Glu Leu Pro Gly Pro Gln Gln Pro Glu Ala Ala Pro Gly Gly Pro

85

90

95

Ser Phe Arg Ser Ser Pro Trp Gln Gln Pro Ala Leu Leu Pro Gln Arg

100

105

110

Arg Arg Gly His Thr Pro Glu Gly Ala Thr Ala Leu Pro Gly Ala Pro  
115 120 125

Ala Ala Lys Gly Glu Pro Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ala Ala Asp Pro  
130 135 140

Arg Lys Gly Gly Arg Pro Gly Ser Ser His Asn Gly Ser Gly Asp Gly  
145 150 155 160

Gly Ala Ala Val Pro Thr Ser Gly Pro Gly Asp Phe Leu Tyr Val Gly  
165 170 175

Val Met Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gly Ser Arg Ala Leu Ala Ala Gln  
180 185 190

Arg Thr Trp Ala Arg Phe Ile Pro Gly Arg Val Glu Phe Phe Ser Ser  
195 200 205

Gln Gln Ser Pro Ser Ala Ala Leu Gly Gln Pro Pro Pro Pro Leu Pro  
210 215 220

Val Ile Ala Leu Pro Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys

225 230 235 240

Ser Phe Met Met Ile Lys Tyr Met His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr

245 250 255

Glu Trp Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Lys

260 265 270

Leu Glu Glu Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Lys Pro Leu Tyr Leu

275 280 285

Gly Gln Thr Gly Leu Gly Asn Thr Glu Glu Leu Gly Lys Leu Gly Leu

290 295 300

Glu Pro Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly Met Ile Phe Ser

305 310 315 320

Arg Glu Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly Glu Cys Leu Arg

325 330 335

Glu Met Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg

340 345 350



Arg Phe Gly Gly Thr Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu  
355 360 365

Phe His Glu Asn Tyr Glu His Asn Arg Lys Gly Tyr Ile Gln Asp Leu  
370 375 380

His Asn Ser Lys Ile His Ala Ala Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Arg  
385 390 395 400

Pro Ala Tyr Gln Tyr Arg Leu His Asn Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile  
405 410 415

Ser Glu Leu Arg Tyr Arg Thr Ile Gln Leu His Arg Glu Ser Ala Leu  
420 425 430

Met Ser Lys Leu Ser Asn Ser Glu Val Ser Lys Glu Asp Gln Gln Leu  
435 440 445

Gly Arg Thr Pro Ser Phe Asn His Phe Gln Pro Arg Glu Arg Asn Glu  
450 455 460

Val Met Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Leu Leu Tyr Ser Ala Ala  
465 470 475 480

Glu Asn Gln Pro Pro Arg Gln Ser Ile Asn Ser Ile Leu Arg Ser Ala  
485 490 495

Leu Asp Asp Thr Val Leu Gln Val Met Glu Met Ile Asn Glu Asn Ala  
500 505 510

Lys Ser Arg Gly Arg Leu Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr  
515 520 525

Arg Arg Val Asp Pro Met His Gly Val Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu  
530 535 540

Leu Leu Tyr Lys Arg His Lys Gly Arg Lys Leu Thr Val Pro Val Arg  
545 550 555 560

Arg His Ala Tyr Leu Gln Gln Pro Phe Ser Lys Pro Phe Phe Arg Glu  
565 570 575

Val Glu Glu Leu Asp Val Asn Arg Leu Val Glu Ser Ile Asn Ser Gly  
580 585 590

Thr Gln Ser Phe Ser Val Ile Ser Asn Ser Leu Lys Ile Leu Ser Ser  
595 600 605

Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Gly Gly His Asn Glu Lys Lys Val His  
610 615 620

Ile Leu Val Pro Leu Val Gly Arg Tyr Asp Ile Phe Leu Arg Phe Met  
625 630 635 640

Glu Asn Phe Glu Ser Thr Cys Leu Ile Pro Lys Gln Asn Val Lys Leu  
645 650 655

Val Ile Ile Leu Phe Ser Arg Asp Ala Gly Gln Glu Ser Ile Lys His  
660 665 670

Ile Glu Leu Ile Gln Glu Tyr Gln Ser Arg Tyr Pro Ser Ala Glu Met  
675 680 685

Met Leu Ile Pro Met Lys Gly Glu Phe Ser Arg Gly Leu Gly Leu Glu

690

695

700

Met Ala Ser Ser Gln Phe Asp Asn Asp Thr Leu Leu Leu Phe Cys Asp  
705 710 715 720

Val Asp Leu Ile Phe Arg Gly Asp Phe Leu Gln Arg Cys Arg Asp Asn  
725 730 735

Thr Val Gln Gly Gln Gln Val Tyr Tyr Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr  
740 745 750

Asp Pro Lys Val Thr His Met Arg Asn Pro Pro Thr Glu Gly Asp Phe  
755 760 765

Val Phe Ser Lys Glu Thr Gly Phe Trp Arg Asp Tyr Gly Tyr Gly Ile  
770 775 780

Thr Cys Ile Tyr Lys Ser Asp Leu Leu Gly Ala Gly Gly Phe Asp Thr  
785 790 795 800

Ser Ile Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Tyr Asn Lys Val  
805 810 815

Ile Leu Ser Gly Leu Arg Pro Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val

820

825

830

His Ile Phe His Pro Val His Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln

835

840

845

Tyr Lys Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala Ser Thr Phe Ala Ser Thr Met

850

855

860

Gln Leu Ala Glu Leu Trp Leu Glu Lys His Leu Gly Val Arg Asp Asn

865

870

875

880

Arg Thr Leu Ser

<210> 67

<211> 2490

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<221> CDS

&lt;222&gt; (1)..(2325)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 67

atg cgg gcg tcg ctg ctg ctg tcc gtg ctg cgg ccc gcg ggg ccc gtg 48

Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val

1 5 10 15

gcc gtg ggc atc tct ctg ggc ttc acc ctg agc ctg ctc agc gtc acc 96

Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr

20 25 30

tgg gtg gag gag cct tgc gga ccc ggg ccg ccc caa ccc gga gac tct 144

Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser

35 40 45

gag ctg ccg ccg cgc ggc aac acc aac gcg gcg cgc cgg ccc aac tcg 192

Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser

50 55 60

gtg cag ccc gga tcc gag cgc gag agg ccc ggg gcc ggc gca ggc acc 240

Val Gln Pro Gly Ser Glu Arg Glu Arg Pro Gly Ala Gly Ala Gly Thr

65 70 75 80

ggt gag agc tgg gag cct cgt gtc ttg ccc tac cat ccc gcg cag cca 288

Gly Glu Ser Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro

85 90 95

ggc cag gcc acc aag aag gcc gtc aga act cgg tat atc agc acg gag 336

Gly Gln Ala Thr Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu  
 100 105 110

ctg ggc atc agg cag aag ctt ctg gtg gca gtg ctg acc tca caa gcc 384  
 Leu Gly Ile Arg Gln Lys Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Ala  
 115 120 125

acg ttg cct aca ctg ggt gtg gct gta aac cga act ctg gga cac cga 432  
 Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg  
 130 135 140

ctg gag cat gta gtg ttc ctg acc ggt gcg agg ggc cgc cgg aca cct 480  
 Leu Glu His Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Thr Pro  
 145 150 155 160

tca ggc atg gcg gtg gtg gca ctg ggc gaa gag agg ccc atc gga cac 528  
 Ser Gly Met Ala Val Val Ala Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His  
 165 170 175

ctg cac ctg gcg ctg cgc cac ctg ctg gag caa cac ggc gat gac ttt 576  
 Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe  
 180 185 190

gac tgg ttt ttc cta gtg cct gat gcc acc tat act gaa gcg cat gga 624  
 Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Ala Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly  
 195 200 205

ctg gac cgc cta gct ggc cac ctc agc ctt gct tca gca acc cat ctc 672  
 Leu Asp Arg Leu Ala Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Thr His Leu

210

215

220

tat ctt ggc cgg ccg cag gac ttc atc ggt gga gat act acc cca ggc 720

Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Asp Thr Thr Pro Gly

225

230

235

240

cgc tac tgc cac ggg ggc ttt gga gtc ttg ctc tct cgc aca ctg cta 768

Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Thr Leu Leu

245

250

255

cag caa ctg cgc ccc cac ctg gaa agc tgc cgc aac gac atc gtc agt 816

Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Ser Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser

260

265

270

gct cgc ccg gat gag tgg ttg ggc cgc tgc atc ctt gat gcc aca ggc 864

Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly

275

280

285

gtg ggc tgt act ggt gac cac gag gga atg cac tac aac tac ctg gaa 912

Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Met His Tyr Asn Tyr Leu Glu

290

295

300

ctg agc ccc ggg gag cct gta cag gag ggg gac cct cgt ttc cgc agc 960

Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro Arg Phe Arg Ser

305

310

315

320

gcc ttg aca gcc cat ccc gtg cgt gac cct gtg cac atg tac cag ctg 1008

Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu

325

330

335



cac aaa gct ttt gcc cgc gct gag ctg gac cgc acg tac cag gag att 1056

His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Asp Arg Thr Tyr Gln Glu Ile

340

345

350

caa gaa ttg cag tgg gag atc cag aat acc agc cga ctg gct gct gat 1104

Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser Arg Leu Ala Ala Asp

355

360

365

ggg gag aga gcc tct gcc tgg cca gtg ggc atc cca gca ccg tct cgc 1152

Gly Glu Arg Ala Ser Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg

370

375

380

cct gcc tca cgc ttt gag gtt ctg cgc tgg gac tac ttc aca gaa caa 1200

Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln

385

390

395

400

tac gcg ttc tcc tgc gcc gat ggc tct ccc cgc tgc ccg ttg cgt ggg 1248

Tyr Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly

405

410

415

gcc gac cag gct gat gtg gct gac gtc ctg ggg aca gcc tta gag gag 1296

Ala Asp Gln Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu

420

425

430

ctc aac cgc cgt tac cag cca gcg ctg cag ctc cag aag caa cag ctg 1344

Leu Asn Arg Arg Tyr Gln Pro Ala Leu Gln Leu Gln Lys Gln Gln Leu

435

440

445

gtg aac ggc tac cgg cgt ttt gat cca gcc cga ggc atg gag tac aca 1392  
 Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr  
 450 455 460

cta gac ctg cag ctg gaa gcg ctg aca ccc cag ggt ggc cgc tgg ccc 1440  
 Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Trp Pro  
 465 470 475 480

ctc acc cgc agg gtg cag ctc ctt cgg ccc ttg agc cga gtg gag atc 1488  
 Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile  
 485 490 495

ttg cct gta ccc tat gtc acc gag gct tct cgg ctc act gtg cta ctg 1536  
 Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu  
 500 505 510

ccg ctg gct gca gcg gaa cga gac ctg gct tct ggc ttc tta gaa gcc 1584  
 Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Phe Leu Glu Ala  
 515 520 525

ttt gcc act gca gcc ctg gaa cct ggt gat gca gca gcc ttg acc ctg 1632  
 Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Leu Thr Leu  
 530 535 540

ctg ctg ctg tat gag cca cgc cag gcc cag cgg gca gcc cac tca gac 1680  
 Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Ala Ala His Ser Asp  
 545 550 555 560

gtc ttc gca cct gtc aag gcc cac gtg gca gag cta gag cgg cgt ttc 1728

Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg Phe  
 565 570 575

cct ggt gcc cgg gtg ccc tgg ctc agt gtg cag aca gca gcg ccc tct 1776  
 Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro Ser  
 580 585 590

cca ctg cgt ctc atg gat ctg ctg tcc aag aag cac cca cta gac act 1824  
 Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp Thr  
 595 600 605

ctg ttc ctg ctg gcc ggg cca gac acg gta ctc aca cct gat ttc ctg 1872  
 Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu  
 610 615 620

aac cgc tgc cgc atg cat gcc atc tct ggc tgg cag gcc ttc ttc ccc 1920  
 Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe Pro  
 625 630 635 640

atg cac ttc cag gcc ttc cac cct gct gtg gct cct cct cag ggc cct 1968  
 Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly Pro  
 645 650 655

ggg cca cca gag ctg ggc cgt gac acc ggt cac ttt gat cgc cag gct 2016  
 Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly His Phe Asp Arg Gln Ala  
 660 665 670

gcc agt gag gca tgc ttc tac aac tcc gac tat gtg gcg gcc cgt ggc 2064  
 Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg Gly

675	680	685	
cgg ctg gtg gcg gcc tcg gag cag gag gag gag ctg ctg gag agc ctg			2112
Arg Leu Val Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser Leu			
690	695	700	
gat gtg tac gag ttg ttt ctg cgc ttc tcc aac ttg cac gtg ctg aga			2160
Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu Arg Phe Ser Asn Leu His Val Leu Arg			
705	710	715	720
gca gta gag cca gcc ttg ctg cag cgc tac cgg gcc cag ccg tgc agt			2208
Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Pro Cys Ser			
	725	730	735
gca cgg ctc agt gaa gac ctt tac cac cgc tgt cgc cag agc gta ctt			2256
Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Arg Gln Ser Val Leu			
	740	745	750
gag ggc ctt ggc tcc cgc acc cag ctt gcc atg ctg ctc ttt gag cag			2304
Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu Gln			
	755	760	765
gaa cag ggg aac agc acc taa gcccctgcac ctgtccctgc tcttccccag			2355
Glu Gln Gly Asn Ser Thr			
770			
gaacctggag ccacgtgccca gcctcgctgg acagggctgg ctgtagcctc agtccttagg			2415
gcagcccact ggtcccttgt ctcttgcttt gttggaccca tgggctcagg acaagccctg			2475

agacagatgc cctag

2490

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 774

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 68

Met Arg Ala Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Gly Pro Val

1

5

10

15

Ala Val Gly Ile Ser Leu Gly Phe Thr Leu Ser Leu Leu Ser Val Thr

20

25

30

Trp Val Glu Glu Pro Cys Gly Pro Gly Pro Pro Gln Pro Gly Asp Ser

35

40

45

Glu Leu Pro Pro Arg Gly Asn Thr Asn Ala Ala Arg Arg Pro Asn Ser

50

55

60

Val Gln Pro Gly Ser Glu Arg Glu Arg Pro Gly Ala Gly Ala Gly Thr

65

70

75

80

Gly Glu Ser Trp Glu Pro Arg Val Leu Pro Tyr His Pro Ala Gln Pro

85

90

95

Gly Gln Ala Thr Lys Lys Ala Val Arg Thr Arg Tyr Ile Ser Thr Glu

100

105

110

Leu Gly Ile Arg Gln Lys Leu Leu Val Ala Val Leu Thr Ser Gln Ala

115

120

125

Thr Leu Pro Thr Leu Gly Val Ala Val Asn Arg Thr Leu Gly His Arg

130

135

140

Leu Glu His Val Val Phe Leu Thr Gly Ala Arg Gly Arg Arg Thr Pro

145

150

155

160

Ser Gly Met Ala Val Val Ala Leu Gly Glu Glu Arg Pro Ile Gly His

165

170

175

Leu His Leu Ala Leu Arg His Leu Leu Glu Gln His Gly Asp Asp Phe

180

185

190

Asp Trp Phe Phe Leu Val Pro Asp Ala Thr Tyr Thr Glu Ala His Gly  
195 200 205

Leu Asp Arg Leu Ala Gly His Leu Ser Leu Ala Ser Ala Thr His Leu  
210 215 220

Tyr Leu Gly Arg Pro Gln Asp Phe Ile Gly Gly Asp Thr Thr Pro Gly  
225 230 235 240

Arg Tyr Cys His Gly Gly Phe Gly Val Leu Leu Ser Arg Thr Leu Leu  
245 250 255

Gln Gln Leu Arg Pro His Leu Glu Ser Cys Arg Asn Asp Ile Val Ser  
260 265 270

Ala Arg Pro Asp Glu Trp Leu Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ala Thr Gly  
275 280 285

Val Gly Cys Thr Gly Asp His Glu Gly Met His Tyr Asn Tyr Leu Glu  
290 295 300

Leu Ser Pro Gly Glu Pro Val Gln Glu Gly Asp Pro Arg Phe Arg Ser  
305 310 315 320

Ala Leu Thr Ala His Pro Val Arg Asp Pro Val His Met Tyr Gln Leu  
325 330 335

His Lys Ala Phe Ala Arg Ala Glu Leu Asp Arg Thr Tyr Gln Glu Ile  
340 345 350

Gln Glu Leu Gln Trp Glu Ile Gln Asn Thr Ser Arg Leu Ala Ala Asp  
355 360 365

Gly Glu Arg Ala Ser Ala Trp Pro Val Gly Ile Pro Ala Pro Ser Arg  
370 375 380

Pro Ala Ser Arg Phe Glu Val Leu Arg Trp Asp Tyr Phe Thr Glu Gln  
385 390 395 400

Tyr Ala Phe Ser Cys Ala Asp Gly Ser Pro Arg Cys Pro Leu Arg Gly  
405 410 415

Ala Asp Gln Ala Asp Val Ala Asp Val Leu Gly Thr Ala Leu Glu Glu



420

425

430

Leu Asn Arg Arg Tyr Gln Pro Ala Leu Gln Leu Gln Lys Gln Gln Leu

435

440

445

Val Asn Gly Tyr Arg Arg Phe Asp Pro Ala Arg Gly Met Glu Tyr Thr

450

455

460

Leu Asp Leu Gln Leu Glu Ala Leu Thr Pro Gln Gly Gly Arg Trp Pro

465

470

475

480

Leu Thr Arg Arg Val Gln Leu Leu Arg Pro Leu Ser Arg Val Glu Ile

485

490

495

Leu Pro Val Pro Tyr Val Thr Glu Ala Ser Arg Leu Thr Val Leu Leu

500

505

510

Pro Leu Ala Ala Ala Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Phe Leu Glu Ala

515

520

525

Phe Ala Thr Ala Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Ala Ala Leu Thr Leu

530

535

540

Leu Leu Leu Tyr Glu Pro Arg Gln Ala Gln Arg Ala Ala His Ser Asp  
545 550 555 560

Val Phe Ala Pro Val Lys Ala His Val Ala Glu Leu Glu Arg Arg Phe  
565 570 575

Pro Gly Ala Arg Val Pro Trp Leu Ser Val Gln Thr Ala Ala Pro Ser  
580 585 590

Pro Leu Arg Leu Met Asp Leu Leu Ser Lys Lys His Pro Leu Asp Thr  
595 600 605

Leu Phe Leu Leu Ala Gly Pro Asp Thr Val Leu Thr Pro Asp Phe Leu  
610 615 620

Asn Arg Cys Arg Met His Ala Ile Ser Gly Trp Gln Ala Phe Phe Pro  
625 630 635 640

Met His Phe Gln Ala Phe His Pro Ala Val Ala Pro Pro Gln Gly Pro  
645 650 655

Gly Pro Pro Glu Leu Gly Arg Asp Thr Gly His Phe Asp Arg Gln Ala  
660 665 670

Ala Ser Glu Ala Cys Phe Tyr Asn Ser Asp Tyr Val Ala Ala Arg Gly  
675 680 685

Arg Leu Val Ala Ala Ser Glu Gln Glu Glu Glu Leu Leu Glu Ser Leu  
690 695 700

Asp Val Tyr Glu Leu Phe Leu Arg Phe Ser Asn Leu His Val Leu Arg  
705 710 715 720

Ala Val Glu Pro Ala Leu Leu Gln Arg Tyr Arg Ala Gln Pro Cys Ser  
725 730 735

Ala Arg Leu Ser Glu Asp Leu Tyr His Arg Cys Arg Gln Ser Val Leu  
740 745 750

Glu Gly Leu Gly Ser Arg Thr Gln Leu Ala Met Leu Leu Phe Glu Gln  
755 760 765

Glu Gln Gly Asn Ser Thr

770

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 984

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(984)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 69

atg ttg ccc tcc cgg agg aaa gcg gcg cag ctg ccc tgg gag gat ggc 48

Met Leu Pro Ser Arg Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly

1 5 10 15

agg gcc agg ttg ctt cct gga ggc ctc cgc cgg aaa tgc tcc atc ttc 96

Arg Ala Arg Leu Leu Pro Gly Gly Leu Arg Arg Lys Cys Ser Ile Phe

20 25 30

cac ctc ttc att gcc ttt ctc ctg ttg gtc ttc ttc tcc ctg ctc tgg 144

His Leu Phe Ile Ala Phe Leu Leu Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu Trp

35 40 45

ctg cag ctc agc tgt tct gga gat atg gcc cag gtg acc agg gga caa 192

Leu Gln Leu Ser Cys Ser Gly Asp Met Ala Gln Val Thr Arg Gly Gln

50

55

60

ggg caa gag acc tcg ggt cca ccc cgg gct tgc cct cca gag ccg ccc 240

Gly Gln Glu Thr Ser Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro

65

70

75

80

cct gag cac tgg gaa gaa gat gag tcc tgg ggg ccc cac cgc ttg gca 288

Pro Glu His Trp Glu Glu Asp Glu Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala

85

90

95

gtg ctg gtg ccc ttt cgt gag cgc ttt gag gag ctg ctg gtc ttt gtg 336

Val Leu Val Pro Phe Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val

100

105

110

ccc cac atg cac cgc ttc cta agc agg aag agg atc cag cac cac atc 384

Pro His Met His Arg Phe Leu Ser Arg Lys Arg Ile Gln His His Ile

115

120

125

tat gtg ctc aac cag gtg gac cat ttc agg ttc aat cgg gca gca ctc 432

Tyr Val Leu Asn Gln Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu

130

135

140

atc aat gtg ggc ttc ctg gag agc agc aac agc aca gac tac atc gcc 480

Ile Asn Val Gly Phe Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala

145

150

155

160

atg cac gat gtg gac ctg ctc cct ctc aat gag gag ctg gac tat ggc 528

Met His Asp Val Asp Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly

165

170

175

ttc ccg gag gct ggg ccc ttc cat gtg gcc tcc cca gag ctc cac cct 576

Phe Pro Glu Ala Gly Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro

180

185

190

ctc tac cac tac aag acc tat gtg ggc ggc att ctg ctg ctg tcc aaa 624

Leu Tyr His Tyr Lys Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys

195

200

205

cag cac tac cag ctg tgc aac gga atg tcc aac cgc ttt tgg ggc tgg 672

Gln His Tyr Gln Leu Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp

210

215

220

ggc cga gag gat gat gaa ttc tac cgg cgc atc aaa gga gct ggc ctc 720

Gly Arg Glu Asp Asp Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu

225

230

235

240

cag ctt ttc cgc ccc tcg gga atc aca act ggg tac cag aca ttt cgc 768

Gln Leu Phe Arg Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Gln Thr Phe Arg

245

250

255

cac ttg cat gac cct gcc tgg cgg aag agg gac caa aaa cgc att gcg 816

His Leu His Asp Pro Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala

260

265

270

gct caa aaa cag gaa cag ttc aag gtg gac cgg gag gga ggc ctg aac 864

Ala Gln Lys Gln Glu Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn

275

280

285

act gtg aag tac cgg gtg gat tcc cgc acg gca ctg tct ata gga ggg 912  
 Thr Val Lys Tyr Arg Val Asp Ser Arg Thr Ala Leu Ser Ile Gly Gly  
 290 295 300

gcc ccg tgc act gtc ctc aat gtc atg ctg gac tgc gat aaa aca gcc 960  
 Ala Pro Cys Thr Val Leu Asn Val Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala  
 305 310 315 320

acc cca tgg tgc ata ttt ggc tga 984  
 Thr Pro Trp Cys Ile Phe Gly  
 325

<210> 70

<211> 327

<212> PRT

<213> mouse

<400> 70

Met Leu Pro Ser Arg Arg Lys Ala Ala Gln Leu Pro Trp Glu Asp Gly  
 1 5 10 15

Arg Ala Arg Leu Leu Pro Gly Gly Leu Arg Arg Lys Cys Ser Ile Phe  
 20 25 30

His Leu Phe Ile Ala Phe Leu Leu Leu Val Phe Phe Ser Leu Leu Trp

35

40

45

Leu Gln Leu Ser Cys Ser Gly Asp Met Ala Gln Val Thr Arg Gly Gln

50

55

60

Gly Gln Glu Thr Ser Gly Pro Pro Arg Ala Cys Pro Pro Glu Pro Pro

65

70

75

80

Pro Glu His Trp Glu Glu Asp Glu Ser Trp Gly Pro His Arg Leu Ala

85

90

95

Val Leu Val Pro Phe Arg Glu Arg Phe Glu Glu Leu Leu Val Phe Val

100

105

110

Pro His Met His Arg Phe Leu Ser Arg Lys Arg Ile Gln His His Ile

115

120

125

Tyr Val Leu Asn Gln Val Asp His Phe Arg Phe Asn Arg Ala Ala Leu

130

135

140

Ile Asn Val Gly Phe Leu Glu Ser Ser Asn Ser Thr Asp Tyr Ile Ala

145

150

155

160



Met His Asp Val Asp Leu Leu Pro Leu Asn Glu Glu Leu Asp Tyr Gly

165

170

175

Phe Pro Glu Ala Gly Pro Phe His Val Ala Ser Pro Glu Leu His Pro

180

185

190

Leu Tyr His Tyr Lys Thr Tyr Val Gly Gly Ile Leu Leu Leu Ser Lys

195

200

205

Gln His Tyr Gln Leu Cys Asn Gly Met Ser Asn Arg Phe Trp Gly Trp

210

215

220

Gly Arg Glu Asp Asp Glu Phe Tyr Arg Arg Ile Lys Gly Ala Gly Leu

225

230

235

240

Gln Leu Phe Arg Pro Ser Gly Ile Thr Thr Gly Tyr Gln Thr Phe Arg

245

250

255

His Leu His Asp Pro Ala Trp Arg Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ile Ala

260

265

270

Ala Gln Lys Gln Glu Gln Phe Lys Val Asp Arg Glu Gly Gly Leu Asn  
275 280 285

Thr Val Lys Tyr Arg Val Asp Ser Arg Thr Ala Leu Ser Ile Gly Gly  
290 295 300

Ala Pro Cys Thr Val Leu Asn Val Met Leu Asp Cys Asp Lys Thr Ala  
305 310 315 320

Thr Pro Trp Cys Ile Phe Gly  
325

# 【0067】

## 【発明の効果】

本発明により、骨パジェット病の新たな検出方法、及び骨パジェット病の病態動物が提供される。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 K3のGalNAc転移活性による奇数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGalNAc転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGalNAc転移活性を示す図である。白三角はコンドロイチン硫酸10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートで $\alpha$ 、黒三角はコンドロイチン10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートである。

【図 2】 K3のGalNAc転移活性により調製された11糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の11糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

【図 3】 K3のGlcUA転移活性による偶数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGlcUA転移活性を示すチャートである。白三角はコンドロイチン硫酸11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒三角はコンドロイチン11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートである。

【図 4】 K3のGlcUA転移活性により調製された12糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の12糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

【図 5】 K11のGalNAc転移活性による奇数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGalNAc転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGalNAc転移活性を示す図である。白三角はコンドロイチン硫酸10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートで $\alpha$ 、黒三角はコンドロイチン10糖に対するGalNAc転移活性を示すチャートである。

【図 6】 K11のGalNAc転移活性により調製された11糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の11糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

【図 7】 K11のGlcUA転移活性による偶数糖の合成を示すクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチン硫酸に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒丸はコンドロイチンに対するGlcUA転移活性を示すチャートである。白三角はコンドロイチン硫酸11糖に対するGlcUA転移活性を示すチャートであり、黒三角はコンドロイチン11糖に対するGlcUA転移活性を示すチ

ャートである。

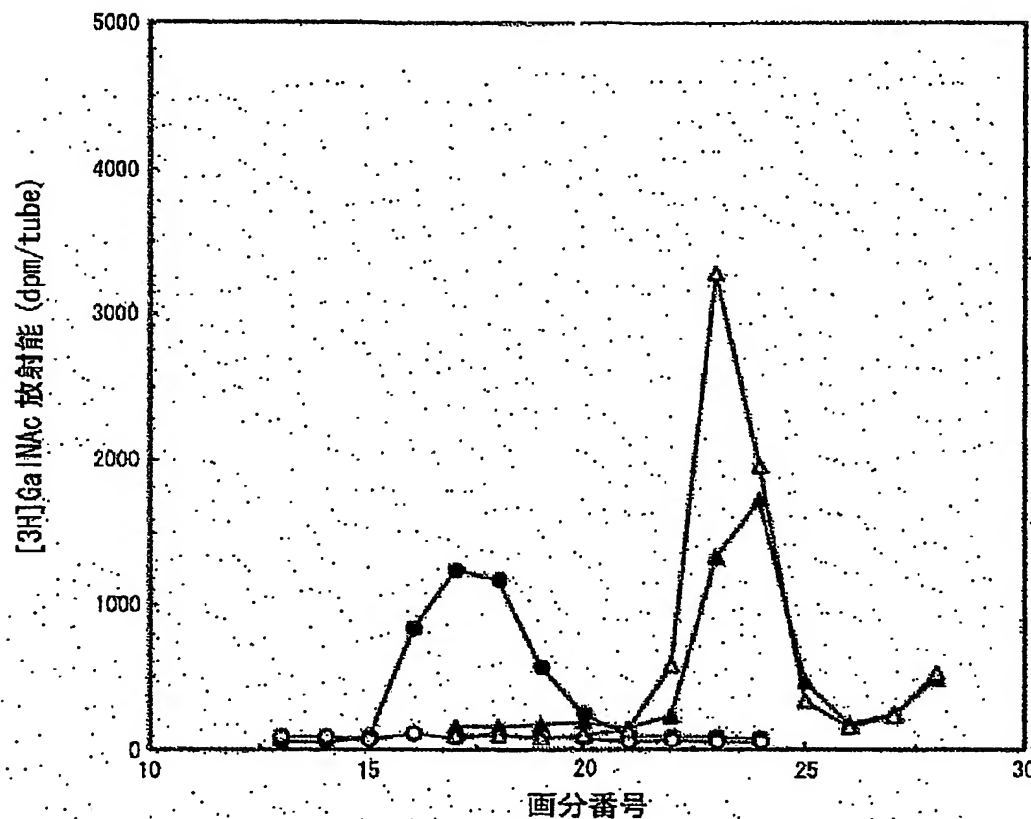
【図 8】 K11のGlcUA転移活性により調製された12糖とそのコンドロイチナーゼACII消化物のクロマトグラフィーのチャートを示す図である。白丸はコンドロイチナーゼACII未消化の12糖のチャートを示し、黒丸はコンドロイチナーゼACII消化後の消化産物のチャートを示す。

【書類名】

図面

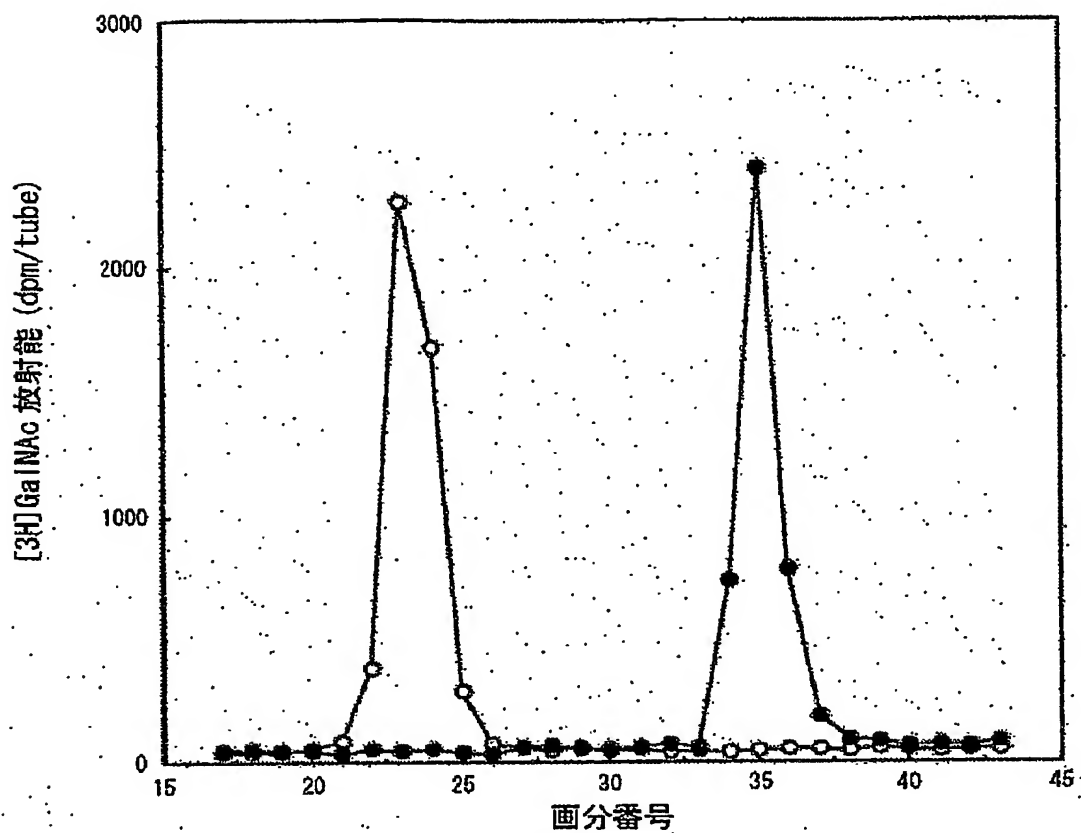
BEST AVAILABLE COPY

【図 1】



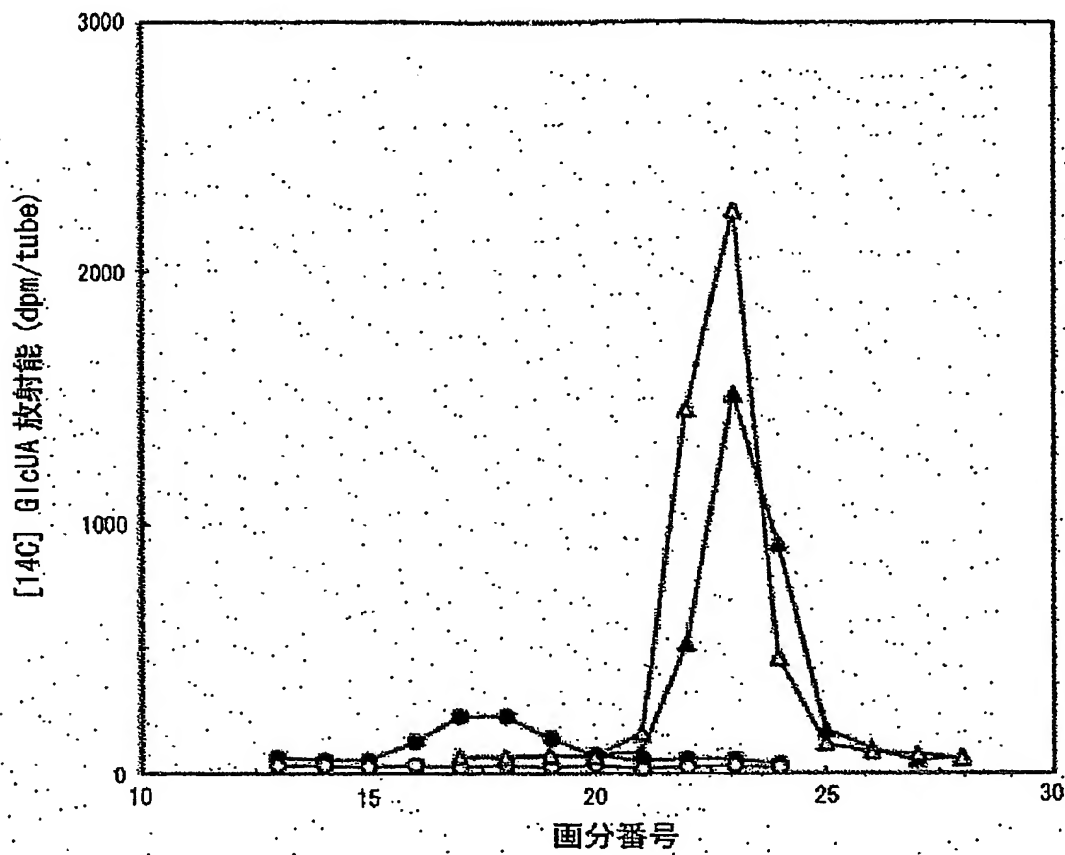
【図 2】

BEST AVAILABLE COPY



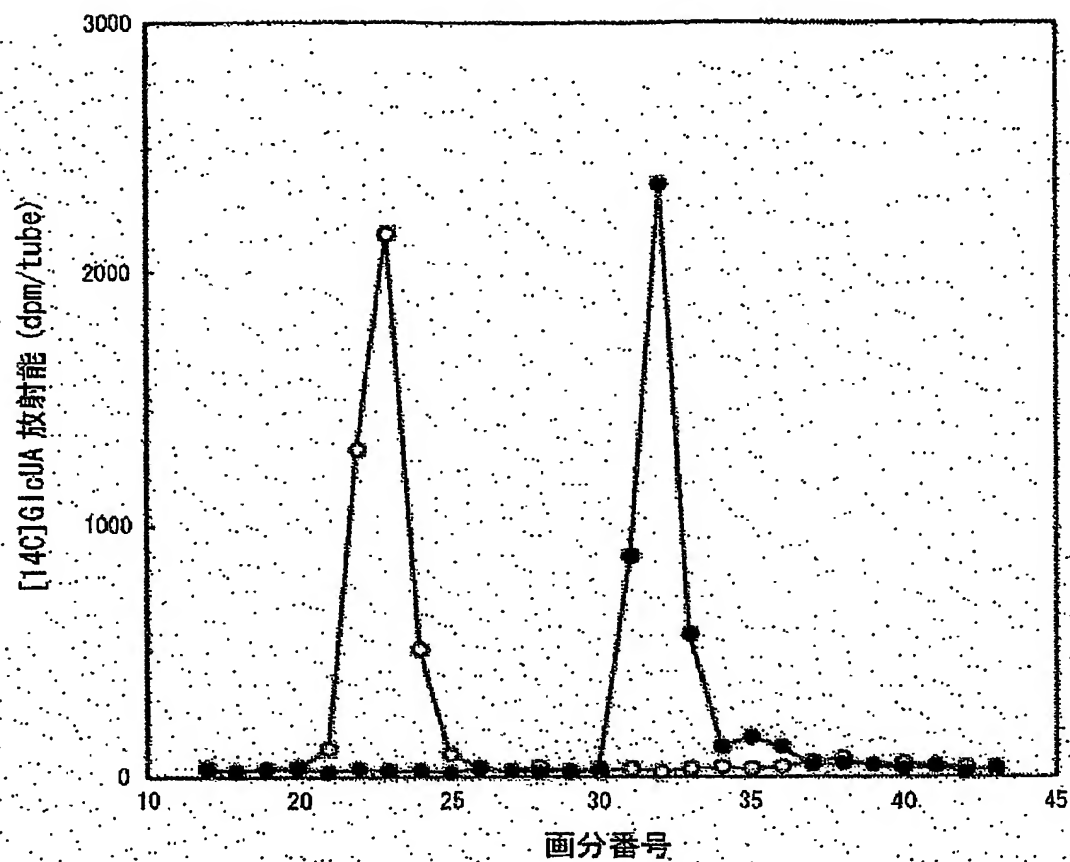
【図 3】

BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY

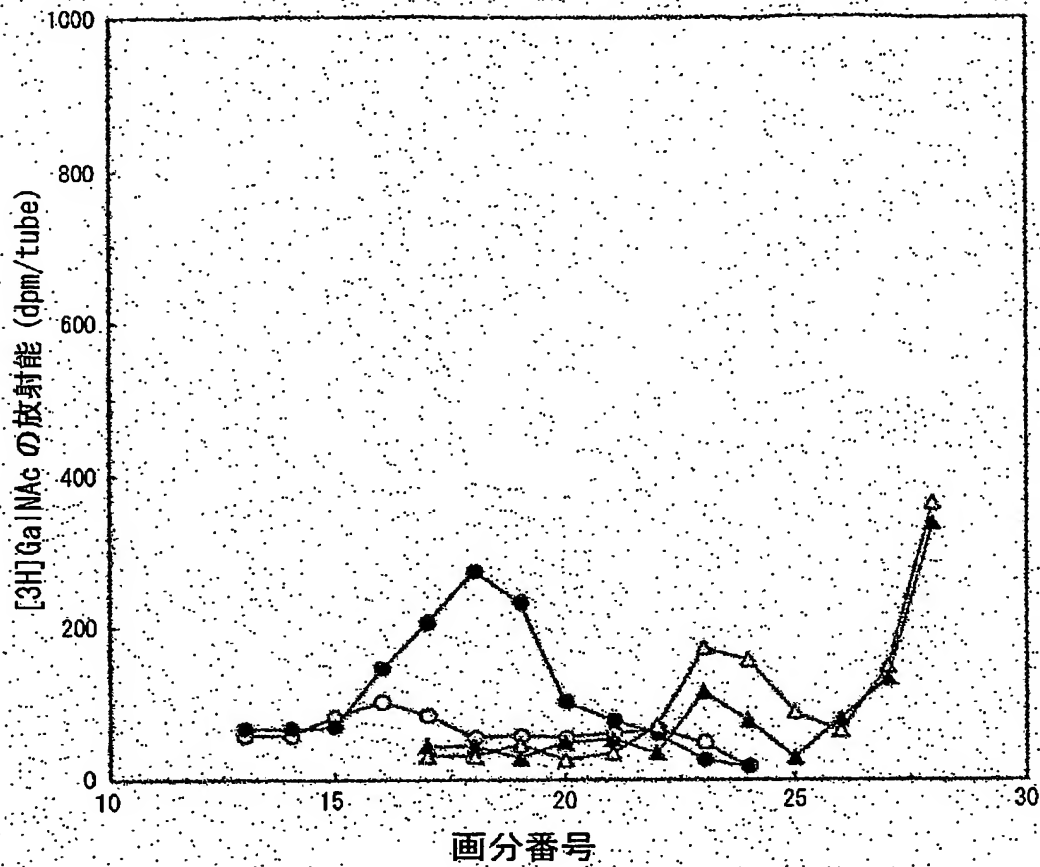
【図 4】





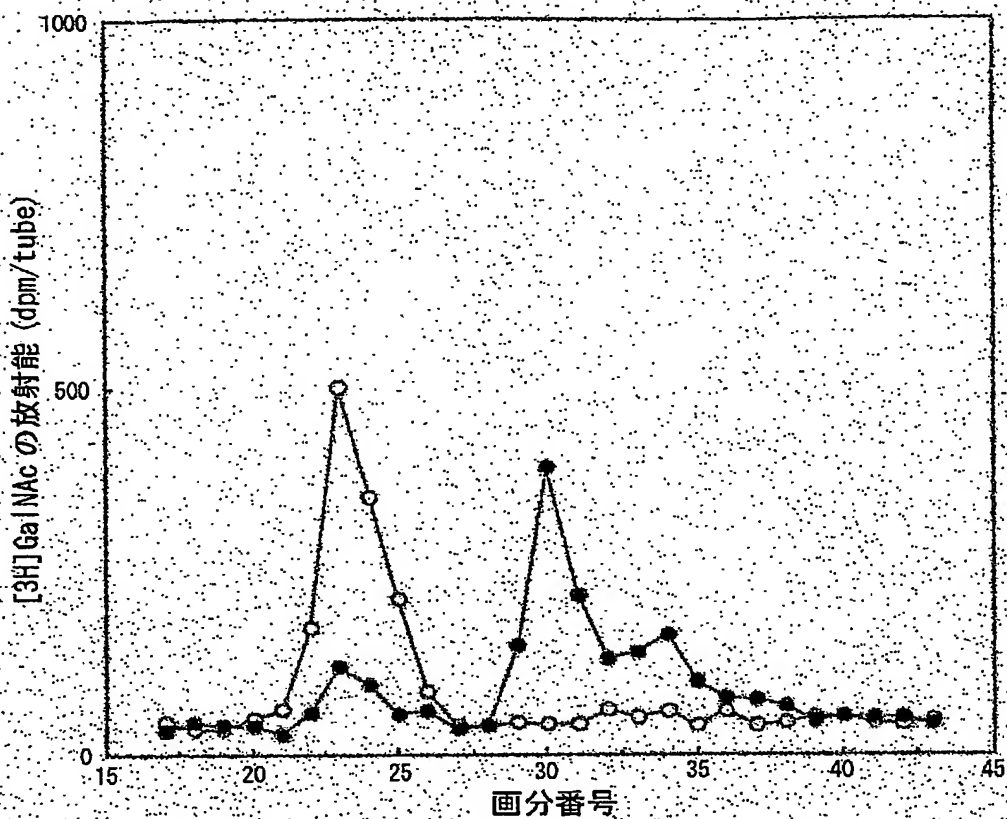
【図 5】

BEST AVAILABLE COPY



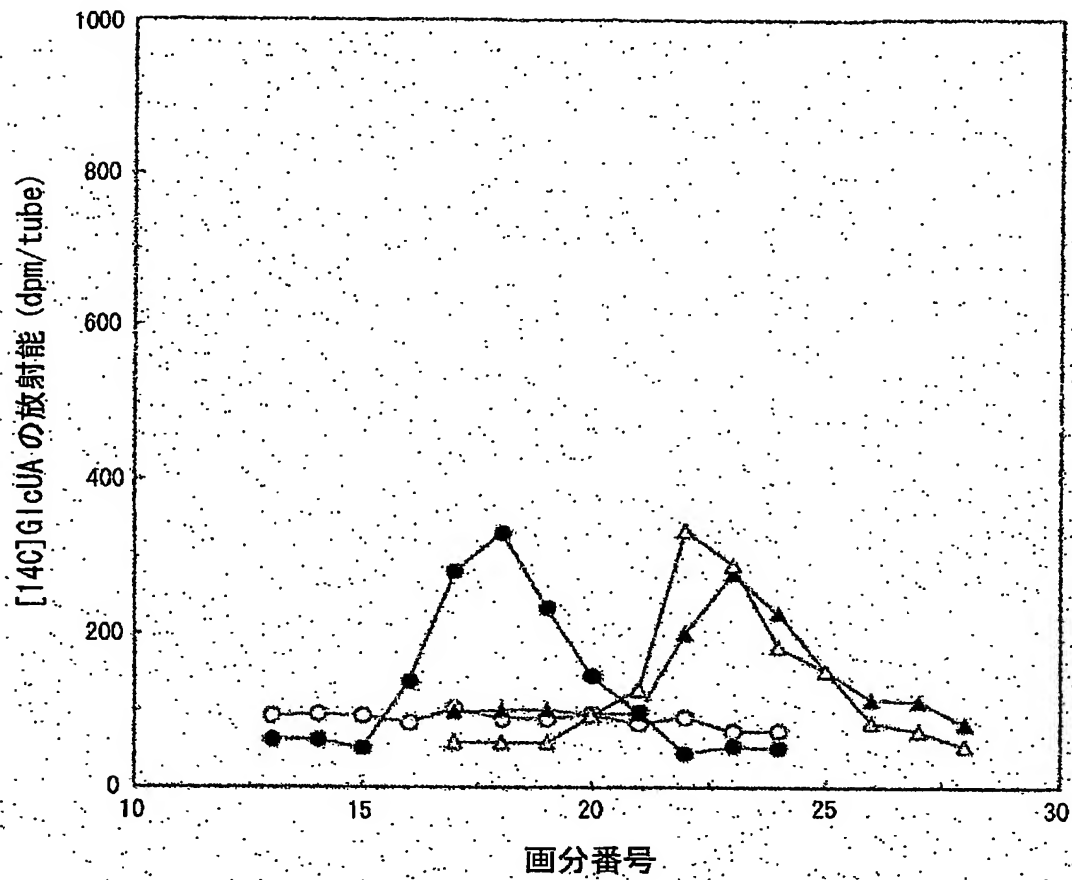
BEST AVAILABLE COPY

【図 6】



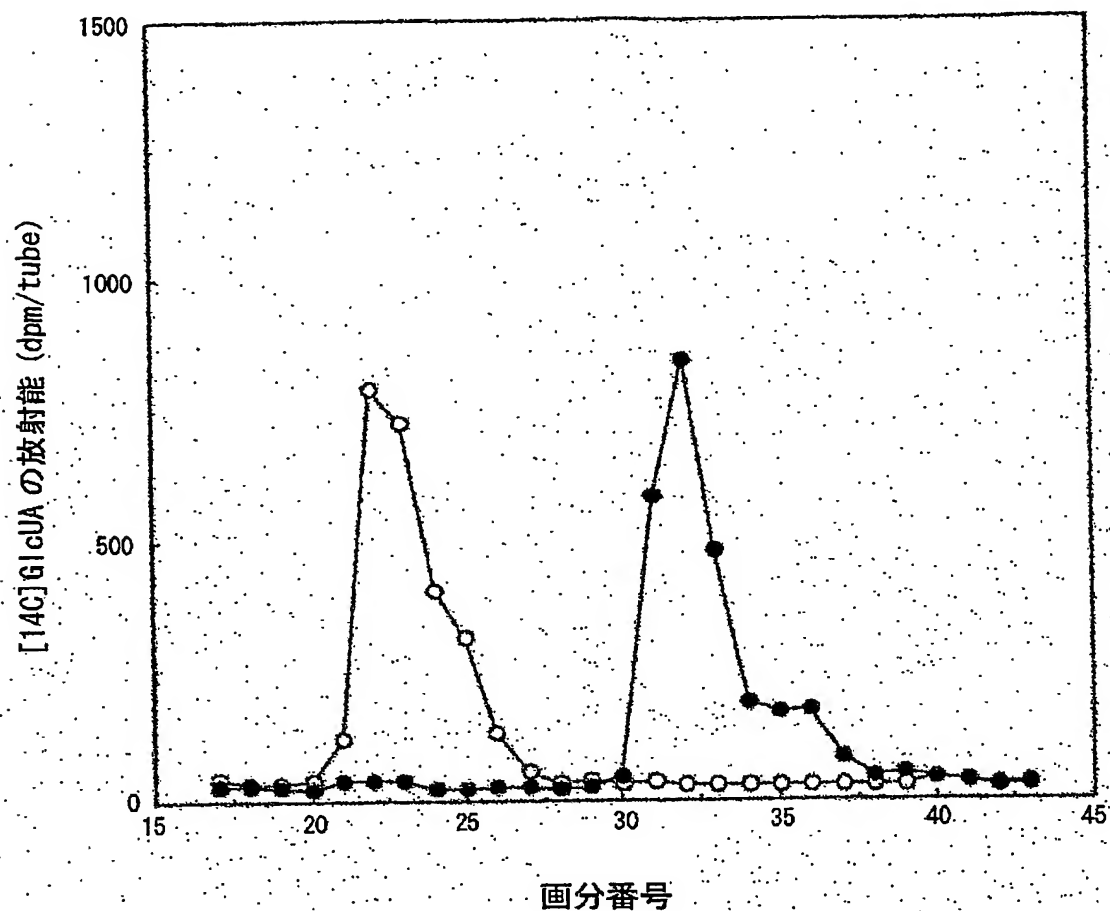
【図 7】

BEST AVAILABLE COPY



【図 8】

BEST AVAILABLE COPY





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 骨パジェット病の検出方法、及び骨パジェット病の病態を示す動物を提供する。

【解決手段】 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 66、配列番号 68 及び配列番号 70 の何れかに記載されたアミノ酸配列からなるコンドロイチン／コンドロイチン硫酸合成酵素の遺伝子の変異又はこれらの発現量と、骨パジェット病とを関連づけ、骨パジェット病の検出、及び前記コンドロイチン／コンドロイチン硫酸合成酵素の遺伝子をノックアウトして得られる、ノックアウト動物。

【選択図】 なし


認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-323438
受付番号	50201680787
書類名	特許願
担当官	小松 清 1905
作成日	平成14年11月15日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年11月 7日
-------	-------------

次頁無



特願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 3 8

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1 . 変 更 年 月 日

2 0 0 1 年   4 月   2 日

[ 変 更 理 由 ]


新 規 登 録

住   所

東 京 都 千 代 田 区 霞 が 関 1 - 3 - 1

氏   名

独 立 行 政 法 人 産 業 技 術 総 合 研 究 所



特願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 3 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 7 1 4 5 7 7 9 ]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 月 2 5 日

[変更理由]

名称変更


住 所

東京都新宿区百人町3丁目25番1号 サンケンビルディング

氏 名

アマシャム バイオサイエンス株式会社





特願 2 0 0 2 - 3 2 3 4 3 8

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 9 5 5 2 4 ]

1 . 変 更 年 月 日

1 9 9 0 年   8 月 2 0 日

[ 変 更 理 由 ]

新 規 登 録

住   所

東 京 都 中 央 区 日 本 橋 本 町 2 丁 目 1 番 5 号

氏   名

生 化 学 工 業 株 式 会 社